

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

HISTOPATOLOGIA DAS REAÇÕES DE RESISTÊNCIA DE HOSPEDEIRO E DE  
NÃO-HOSPEDEIRO EM INTERAÇÕES *Puccinia triticina* X POACEAE

Caroline de Lima Wesp  
Mestre em Fitotecnia/UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia  
Ênfase Fitopatologia

Porto Alegre (RS), Brasil  
Julho de 2011

## FOLHA DE HOMOLOGAÇÃO

*Não basta a arte, nem basta a ciência. É indispensável a paciência".  
[J.W. von Goethe]*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao Prof. José Antônio Martinelli, pela amizade, pela valiosa orientação, profissionalismo e dedicação dispensados ao trabalho.

À minha co-orientadora, Márcia Soares Chaves, pela disponibilidade, pelo entusiasmo contagiante e pelas idéias e sugestões sempre oportunas.

Aos colegas de laboratório, Felipe Graichen, Daniela Henrique e Paulo Vítor pela amizade, companheirismo e ajuda. À Carolina Bremm, pelo auxílio estatístico e aos colegas Ismail, Janaína e Fernanda, pelos momentos de descontração e amizade.

A toda a minha família, em especial, aos meus pais, Daltro e Sara, que não mediram esforços para minha educação, permitindo que eu chegasse até aqui. Aos meus irmãos Cristiane e Mateus, companheiros de todas as horas.

Ao meu namorado Diego Guterres pelo amor e apoio incondicionais, principalmente nas horas mais difíceis.

À UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, a todos os professores e funcionários que fizeram parte desta trajetória e a CAPES pela concessão de uma bolsa de estudos.

O meu muito obrigada!

# HISTOPATOLOGIA DAS REAÇÕES DE RESISTÊNCIA DE HOSPEDEIRO E DE NÃO-HOSPEDEIRO EM INTERAÇÕES *Puccinia triticina* X POACEAE<sup>1</sup>

Autora: Caroline de Lima Wesp  
Orientador: José Antônio Martinelli  
Co-orientadora: Márcia Soares Chaves

## RESUMO

A ferrugem da folha, causada pelo fungo *Puccinia triticina*, é uma das principais doenças do trigo. As condições ambientais presentes na região do Cone Sul da América do Sul, associadas à grande variabilidade genética para virulência do patógeno, favorecem a ocorrência de epidemias anuais. Desta forma, é comum a superação da resistência em variedades com genes específicos à raças de ferrugem. Neste contexto, a identificação de mecanismos de resistência potencialmente duráveis é de extrema importância. O objetivo deste trabalho foi caracterizar os eventos histológicos responsáveis pela reação de resistência em interações de hospedeiros (trigo suscetível (BRS 194), com resistência específica (*Lr9*) e não-específica à raças (Toropi)) e não-hospedeiros (cevada (BRS 195), aveia (URS 22) e arroz (Irga 417 e Nippon Bare)) à *Puccinia triticina*. Para isso, as plantas foram inoculadas com a raça B56 de *P. triticina* e foram feitas coletas de segmentos foliares de 1,5 cm de cada espécie em diferentes horários após a inoculação, onde foram quantificadas as estruturas infectivas formadas, bem como, as reações de resistência apresentadas pelos genótipos, nas fases de plântula e planta adulta. Os genótipos testados apresentaram diferentes mecanismos de resistência, ativos em momentos distintos do processo infeccioso. Em aveia a resistência foi pré-haustorial e envolveu a formação de papila. Em arroz a resistência foi pré-haustorial, com produção de compostos autofluorescentes e formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em cevada houve a combinação de mecanismos de resistência pré e pós-haustoriais, o que também foi verificado no genótipo de trigo com resistência parcial, não específica à raças, Toropi. A linhagem isogênica de trigo *Lr9* apresentou resistência do tipo pós-haustorial, induzindo a morte celular por hipersensibilidade. Os resultados sugerem que a resistência parcial à *P. triticina* se assemelha à resistência de não-hospedeiros observada. Ambas são ativas e envolvem a combinação de diferentes mecanismos de defesa. O conhecimento a respeito dos mecanismos de resistência atuantes em espécies não-hospedeiras pode auxiliar no entendimento das relações patógeno-hospedeiro, visando à obtenção de variedades comerciais com formas mais duráveis de resistência. A combinação de diferentes mecanismos de resistência em Toropi pode ser responsável pela manutenção da resistência, bem como, pela baixa severidade da doença observada no campo.

---

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (156 p.) Julho, 2011.

# HISTOPATHOLOGY OF RESISTANCE REACTIONS ON HOST AND NON-HOST INTERACTIONS IN *Puccinia triticina* X POACEAE<sup>1</sup>

Author: Caroline de Lima Wesp  
Adviser: José Antônio Martinelli  
Co-adviser: Márcia Soares Chaves

## ABSTRACT

Leaf rust, caused by the fungus *Puccinia triticina*, is one of the major diseases of wheat. The environmental conditions present in the Southern Cone of South America, associated with a high genetic variability for virulence of the pathogen, favoring the occurrence of annual epidemics. Thus, it is common the overcome of resistance in varieties with specific resistance genes. In this context, the identification of potentially durable resistance mechanisms is of utmost importance. The objective of this study was to characterize the histological events responsible for the resistance reaction in host interactions (susceptible wheat (BRS 194), with specific resistance (*Lr9*) and non-specific resistance (Toropi)) and non-host (barley (BRS 195), oat (URS 22) and rice (IRGA 417 and Nippon Bare)) to *Puccinia triticina*. For this, plants were inoculated with race B56 of *P. triticina* and collections were made from 1.5 cm leaf segments of each species at different times after inoculation, which were quantified for infective structures formed, as well as the reactions of resistance displayed by genotypes at the stage of seedling and adult plant. The genotypes showed different resistance mechanisms, active at different times of the infectious process. In oat resistance has been pre-haustorial and involved the formation of papillae. Resistance in rice has been pre-haustorial, with production of autofluorescent compounds and the formation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In barley there was a combination of pre and post-haustorial mechanisms. The same was found in wheat genotype with partial resistance, Toropi. The isogenic line *Lr9* showed post-haustorial resistance, inducing hypersensitive cell death. The results suggest that partial resistance to *P. triticina* resembles the non-host resistance observed. Both are active and involve a combination of different defense mechanisms. Knowledge about the resistance mechanisms operating in non-host species may assist in understanding the pathogen-host relationships, towards to obtain commercial varieties with more durable forms of resistance. The combination of different mechanisms of resistance in Toropi may be responsible for maintaining the resistance, as well as by the low disease severity observed in the field.

---

<sup>1</sup> Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (156 p.) July, 2011.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.2 Objetivo geral.....	3
1.2.1 Objetivos específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 Interações patógeno-hospedeiro entre <i>Puccinia</i> x Poaceae.....	5
3.2 Natureza da resistência nas interações <i>Puccinia</i> x Poaceae.....	13
3.2.1 Resistência de hospedeiro.....	13
3.2.2 Resistência de não-hospedeiro.....	15
3.3 Componentes histopatológicos da resistência nos patossistemas <i>Puccinia</i> x Poaceae.....	20
3.4 Ferrugem da folha do trigo.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Material genético.....	33
4.2 Semeadura e tratos culturais.....	34
4.3 Inóculo e inoculação.....	34
4.4 Amostragem.....	35
4.5 Quantificação dos componentes histológicos da resistência à ferrugem da folha do trigo em hospedeiros e não-hospedeiros.....	36
4.5.1 Coloração e exame microscópico.....	36
4.5.1.2 Eventos infectivos iniciais em genótipos hospedeiros.....	36
4.5.1.3 Eventos infectivos intermediários e finais.....	37
4.5.1.3.1 Avaliações na fase de plântula.....	37
4.5.1.3.2 Avaliações na fase de planta adulta.....	38
4.5.2 Análise dos dados.....	39
4.6 Avaliações histológicas e histoquímicas das reações de resistência à ferrugem da folha do trigo em hospedeiros e não-hospedeiros.....	40
4.6.1 Histopatologia e respostas de defesa.....	40
4.6.2 Histolocalização de compostos autofluorescentes.....	41
4.6.3 Histolocalização de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	42
4.6.4 Análise dos dados.....	43
4.6.5 Análises histopatológicas em microscopia espectral confocal..	43
4.7 Exame macroscópico.....	44
5 RESULTADOS.....	46

5.1	Quantificação dos componentes histológicos de resistência à ferrugem da folha do trigo em hospedeiros e não-hospedeiros.....	46
5.1.1	Coloração e exame microscópico.....	46
5.1.1.2	Eventos infectivos iniciais em genótipos hospedeiros.....	46
5.1.1.3	Eventos infectivos intermediários e finais.....	52
5.1.2	Avaliações na fase de plântula.....	52
5.1.3	Avaliações na fase de planta adulta.....	64
5.2	Avaliações histológicas e histoquímicas das reações de resistência à ferrugem da folha do trigo em hospedeiros e não-hospedeiros.....	75
5.2.1	Histopatologia e respostas de defesa.....	75
a)	Ocorrência de morte celular associada à tentativas de colonização.....	75
a.a)	Plântulas.....	75
a.b)	Planta adulta.....	78
b)	Formação de papilas na parede celular do hospedeiro.....	80
b.a)	Plântulas.....	80
b.b)	Planta adulta.....	81
5.3	Histolocalização de compostos autofluorescentes.....	82
a)	Plântulas.....	82
b)	Planta adulta.....	85
5.4	Histolocalização de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	87
a)	Plântulas.....	87
b)	Planta adulta.....	90
5.5	Análises histopatológicas em microscopia espectral confocal.....	95
5.6	Exame macroscópico.....	97
a)	Planta adulta.....	97
b)	Plântulas.....	99
6	DISCUSSÃO.....	103
7	CONCLUSÕES.....	136
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138
9	APÊNDICES.....	154



## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Reação, tipo de infecção e sintomas de <i>Puccinia triticina</i> sobre a primeira folha de trigo (Roelfs <i>et al.</i> , 1992). Porto Alegre, RS. 2011.....	45
2. Germinação de esporos de <i>Puccinia triticina</i> sobre folhas de diferentes espécies de Poaceae, na fase de plântula, em 48 e 120 hai. Porto Alegre, RS. 2011.....	54
3. Diferenciação de apressórios de <i>Puccinia triticina</i> sobre estômatos de diferentes espécies de Poaceae, na fase de plântula, em 48 e 120 hai. Porto Alegre, RS. 2011.....	55
4. Diferenciação de vesículas sub-estomatais de <i>Puccinia triticina</i> em diferentes espécies de Poaceae, na fase de plântula, em 48 e 120 hai. Porto Alegre, RS. 2011.....	56
5. Diferenciação de hifas infectivas de <i>Puccinia triticina</i> em diferentes espécies de Poaceae, na fase de plântula, em 48 e 120 hai. Porto Alegre, RS. 2011.....	58
6. Diferenciação de células-mãe-de-haustórios de <i>Puccinia triticina</i> em diferentes espécies de Poaceae, na fase de plântula, em 48 e 120 hai. Porto Alegre, RS. 2011.....	59
7. Diferenciação de haustórios de <i>Puccinia triticina</i> em diferentes espécies de Poaceae, na fase de plântula, em 48 e 120 hai. Porto Alegre, RS. 2011.....	60
8. Germinação de esporos de <i>Puccinia triticina</i> sobre folhas de diferentes espécies de Poaceae, 48 e 120 hai, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 201.....	65
9. Diferenciação de apressórios de <i>Puccinia triticina</i> sobre estômatos de diferentes espécies de Poaceae, 48 e 120 hai, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.....	66
10. Diferenciação de vesículas sub-estomatais de <i>Puccinia triticina</i> em diferentes espécies de Poaceae, 48 e 120 hai, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.....	67

11. Diferenciação de hifas infectivas de <i>Puccinia triticina</i> em diferentes espécies de Poaceae, 48 e 120 hai, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.....	68
12. Diferenciação de células-mãe-de-haustórios de <i>Puccinia triticina</i> em diferentes espécies de Poaceae, 48 e 120 hai, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.....	69
13. Diferenciação de haustórios de <i>Puccinia triticina</i> em diferentes espécies de Poaceae, 48 e 120 hai, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.....	70
14. Ocorrência de morte celular em resposta à tentativa de infecção por <i>Puccinia triticina</i> em diferentes espécies de Poaceae, 48 e 120 hai, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.....	77
15. Ocorrência de morte celular em resposta à tentativa de infecção por <i>Puccinia triticina</i> em diferentes espécies de Poaceae, 48 e 120 hai, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.....	80
16. Ocorrência de autofluorescência em resposta à tentativa de infecção por <i>Puccinia triticina</i> em diferentes espécies de Poaceae, 48 e 120 hai, na fase de plântula. ASE= apressório sobre estômato, VSE= vesícula sub-estomatal. Porto Alegre, RS. 2011.....	84
17. Ocorrência de autofluorescência em resposta à tentativa de infecção por <i>Puccinia triticina</i> em diferentes espécies de Poaceae, 48 e 120 hai, na fase de planta adulta. ASE= apressório sobre estômato, VSE= vesícula sub-estomatal. Porto Alegre, RS. 2011.....	87
18. Produção de espécies reativas de oxigênio em resposta à tentativa de infecção por <i>Puccinia triticina</i> em diferentes espécies de Poaceae e horários, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.....	89
19. Produção de espécies reativas de oxigênio em resposta à tentativa de infecção por <i>Puccinia triticina</i> em diferentes espécies de Poaceae e horários, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.....	91
20. Sumarização dos eventos infectivos e reações de resistência em resposta a inoculação por <i>Puccinia triticina</i> em diferentes espécies de Poaceae, nas fases de plântula e planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.....	94
21. Tipo de infecção <sup>a</sup> em genótipos hospedeiros e não-hospedeiros, na fase de planta adulta, resultante de inoculações com <i>Puccinia triticina</i> . Porto Alegre, RS. 2011.....	98

	Página
22. Tipo de infecção <sup>a</sup> em distintos genótipos, resultante de inoculações com <i>Puccinia triticina</i> , na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.....	101
23. Coeficientes de correlação de Pearson entre os componentes histológicos da resistência à <i>Puccinia triticina</i> na fase de plântula, 48 horas após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2011.....	154
24. Coeficientes de correlação de Pearson entre os componentes histológicos da resistência à <i>Puccinia triticina</i> na fase de planta adulta, 48 horas após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2011.....	154
25. Coeficientes de correlação de Pearson entre os componentes histológicos da resistência à <i>Puccinia triticina</i> na fase de plântula, 120 horas após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2011.....	155
26. Coeficientes de correlação de Pearson entre os componentes histológicos da resistência à <i>Puccinia triticina</i> na fase de planta adulta, 120 horas após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2011.....	156

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Diferenciação temporal das estruturas de infecção de <i>Uromyces fabae</i> Pers. Fonte: <a href="http://www.botany.ubc.ca/bakkeren/rust">http://www.botany.ubc.ca/bakkeren/rust</a> .....	9
2. Processos de penetração, crescimento e esporulação de <i>Uromyces fabae</i> . Fonte: <a href="http://www.science.org.au">http://www.science.org.au</a> .....	11
3. Esporos de <i>Puccinia triticina</i> germinados na superfície de folha da cultivar de trigo BRS 194, com orientação do crescimento no sentido perpendicular à nervura das folhas. A= 200x. Porto Alegre, RS. 2011.....	47
4. Proporção de esporos de <i>Puccinia triticina</i> germinados sobre folhas de genótipos de trigo resistente e suscetível, 6, 12 e 18 horas após a inoculação, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.....	47
5. Desenvolvimento de apressório de <i>Puccinia triticina</i> na cultivar de trigo BRS 194, na fase de planta adulta, 6 hai. A= 400x. Porto Alegre, RS. 2011.....	48
6. Proporção de apressórios de <i>Puccinia triticina</i> formados sobre estômatos de genótipos de trigo resistente e suscetível, 6, 12 e 18 horas após a inoculação, em relação ao número de esporos germinados, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.....	49
7. Desenvolvimento de apressório de <i>Puccinia triticina</i> em célula da epiderme da cultivar de trigo BRS 194, na fase de planta adulta, 6 hai. A= 400x. Porto Alegre, RS. 2011.....	49
8. Proporção de vesículas sub-estomatais de <i>Puccinia triticina</i> formadas em genótipos de trigo resistente e suscetível, 6, 12 e 18 horas após a inoculação, em relação ao número de apressórios formados sobre estômatos, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.....	50
9. Desenvolvimento de vesícula sub-estomatal (VSE) e hifa infectiva (HF) de <i>Puccinia triticina</i> na cultivar de trigo Toropi, na fase de planta adulta, 18 hai. A= 400x. Porto Alegre, RS. 2011.....	50

10. Proporção de hifas infectivas de <i>Puccinia triticina</i> formadas em genótipos de trigo resistente e suscetível, 6, 12 e 18 horas após a inoculação, em relação ao número de vesículas sub-estomatais formadas, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.....	51
11. Desenvolvimento de hifa infectiva (HF) e de célula-mãe-de-haustório (CMH) de <i>Puccinia triticina</i> na cultivar de trigo BRS 194, na fase de planta adulta, 18 hai. A= 400x. Seta indica a CMH. Porto Alegre, RS. 2011.....	52
12. Proporção de células-mãe-de-haustórios de <i>Puccinia triticina</i> formadas em genótipos de trigo resistente e suscetível, 6, 12 e 18 horas após a inoculação, em relação ao número de hifas infectivas formadas, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.....	52
13. Proporção de esporos de <i>Puccinia triticina</i> germinados sobre folhas de diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 horas após a inoculação, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.....	53
14. Proporção de apressórios de <i>Puccinia triticina</i> formados sobre estômatos de diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 horas após a inoculação, em relação ao número de esporos germinados, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.....	54
15. Proporção de vesículas sub-estomatais de <i>Puccinia triticina</i> formadas em diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 horas após a inoculação, em relação ao número de apressórios formados sobre estômatos, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.....	56
16. Formação de vesícula sub-estomatal de <i>Puccinia triticina</i> em folhas de arroz, 48 hai, em fase de plântula. a) Irga 417 e b) Nippon Bare. A= 400x. Apressório sobre estômato= ASE; vesícula sub-estomatal= VSE. Porto Alegre, RS. 2011.....	56
17. Amarelecimento de células do mesófilo de arroz decorrente da formação de apressórios de <i>Puccinia triticina</i> sobre estômatos, em fase de plântula. a) Irga 417, 120 hai, A= 400x e b) Nippon Bare, 240 hai, A= 200x. Apressório sobre estômato= ASE; vesícula sub-estomatal= VSE. Porto Alegre, RS. 2011.....	57
18. Proporção de hifas infectivas de <i>Puccinia triticina</i> formadas em diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 horas após a inoculação, em relação ao número de vesículas sub-estomatais formadas, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.....	57

19. Proporção de células-mãe-de-haustórios de <i>Puccinia triticina</i> formadas em diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 horas após a inoculação, em relação ao número de hifas infectivas formadas, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.....	58
20. Proporção de haustórios de <i>Puccinia triticina</i> formados em diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 horas após a inoculação, em relação ao número de células-mãe-de-haustórios formadas, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.....	59
21. Formação de tecido esporogênico de <i>Puccinia triticina</i> no mesófilo do genótipo de trigo BRS 194, na fase de plântula, 120 horas após a inoculação. A seta indica a diferenciação de tecido esporogênico. A= 400x. Porto Alegre, RS. 2011.....	61
22. Proporção de colônias de <i>Puccinia triticina</i> estabelecidas e de formação de tecido esporogênico, 120 horas após a inoculação, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.....	61
23. Restrição da infecção por <i>Puccinia triticina</i> em diferentes espécies de Poaceae, na fase de plântula. As setas indicam em que momento a infecção foi paralisada. Apressório sobre estômato= ASE; vesícula subestomal= VSE; hifa infectiva= HF; célula-mãe-de-haustório= CMH; haustório= H. Porto Alegre, RS. 2011.....	62
24. Número potencial de colônias de <i>Puccinia triticina</i> formadas em espécie hospedeira (trigo) e não-hospedeira (arroz), na fase de plântula, restritas sequencialmente aos eventos infectivos, a partir de um número hipotético de 1000 esporos depositados por planta. Porto Alegre, RS. 2011.....	62
25. Número potencial de colônias de <i>Puccinia triticina</i> formadas em espécie hospedeira (trigo) e não-hospedeira (aveia), na fase de plântula, restritas sequencialmente aos eventos infectivos, a partir de um número hipotético de 1000 esporos depositados por planta. Porto Alegre, RS. 2011.....	63
26. Número potencial de colônias de <i>Puccinia triticina</i> formadas em espécie hospedeira (trigo) e não-hospedeira (cevada), na fase de plântula, restritas sequencialmente aos eventos infectivos, a partir de um número hipotético de 1000 esporos depositados por planta. Porto Alegre, RS. 2011.....	63
27. Proporção de esporos de <i>Puccinia triticina</i> germinados sobre folhas de diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 hai, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.....	64
28. Proporção de apressórios de <i>Puccinia triticina</i> formados sobre estômatos de diferentes espécies de Poaceae em 48 e 120 hai, em relação ao número de esporos germinados, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.....	66

29. Proporção de vesículas sub-estomatais de <i>Puccinia triticina</i> formadas em diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 hai, em relação ao número de apressórios formados sobre estômatos, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.....	67
30. Proporção de hifas infectivas de <i>Puccinia triticina</i> formadas em diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 hai, em relação ao número de vesículas sub-estomatais formadas, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.....	68
31. Proporção de células-mãe-de-haustórios de <i>Puccinia triticina</i> formadas em diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 hai, em relação ao número de hifas infectivas formadas, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.....	69
32. Proporção de haustórios de <i>Puccinia triticina</i> formados em diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 hai, em relação ao número de células-mãe-de-haustórios formadas, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.....	70
33. Colonização dos tecidos por <i>Puccinia triticina</i> no genótipo de trigo BRS 194, na fase de planta adulta, 120 hai. a) Hifas intercelulares, células-mãe-de-haustórios (CMHs) e haustórios, A= 400x; b) Célula do mesófilo contendo haustório em seu interior, A=1000x. Porto Alegre, RS. 2011.....	71
34. Proporção de colônias de <i>Puccinia triticina</i> estabelecidas e associadas à formação de tecido esporogênico, 240 hai, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.....	72
35. Micélio de <i>Puccinia triticina</i> na câmara sub-estomática do genótipo de trigo Toropi, na fase planta adulta, 240 hai. Corte de região sem pústulas. A=1000x. Porto Alegre, RS. 2011.....	73
36. Restrição da infecção por <i>Puccinia triticina</i> em diferentes espécies de Poaceae, na fase de planta adulta. As setas indicam em que momento a infecção foi paralisada. Apressório sobre estômato= ASE; vesícula sub-estomal= VSE; hifa infectiva= HF; célula-mãe-de-haustório= CMH; haustório= H. Porto Alegre, RS. 2011.....	74
37. Número potencial de colônias de <i>Puccinia triticina</i> formadas em genótipo suscetível e com resistência parcial, na fase de planta adulta, restritas sequencialmente aos eventos infectivos, a partir de um número hipotético de 1000 esporos depositados por planta. Porto Alegre, RS. 2011.....	75

38. Morte celular em resposta à tentativa de colonização por *Puccinia triticina*, na fase de plântula, 48 hai. a) Cevada BRS 195, A= 200x e b) aveia URS 22, A= 400x. MC= morte celular. Porto Alegre, RS. 2011..... 76
39. Proporção de tentativas de colonização de *Puccinia triticina* associadas com a ocorrência de morte celular em 48 e 120 hai, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011..... 77
40. Pústulas de *Puccinia triticina* associadas à morte celular, formadas no genótipo de cevada BRS 195, na fase de plântula, 240 hai. A= 200x. Porto Alegre, RS. 2011..... 78
41. Morte celular em decorrência da formação de haustórios no genótipo de trigo *Lr9*, na fase de planta adulta. a) Célula do mesófilo com haustório em seu interior, intensamente corada com Trypan Blue, 48 hai, A= 400x; b) Células do mesófilo com morte celular, 120 hai, A= 200x. Porto Alegre, RS. 2011..... 79
42. Proporção de tentativas de colonização de *Puccinia triticina* associadas com a ocorrência de morte celular em 48 e 120 hai, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011..... 79
43. Morte celular em resposta à tentativa de colonização por *Puccinia triticina* no genótipo de trigo Toropi, na fase de planta adulta, 240 hai. a) Esporo com apressório sobre estômato (ASE), vesícula sub-estomatal (VSE) e morte celular em A= 200X e b) A= 400x. Porto Alegre, RS. 2011..... 80
44. Formação de papila em célula do mesófilo do genótipo de aveia URS 22 em resposta à tentativa de penetração por *Puccinia triticina*, na fase de plântula. a) Sem contraste de fases e b) com contraste de fases, 120 hai, A= 1000x. Porto Alegre, RS. 2011.1..... 81
45. Proporção de tentativas de colonização de *Puccinia triticina* associadas com a formação de papilas, em 48 e 120 hai, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011..... 81
46. Proporção de células com autofluorescência associadas à tentativas de penetração e colonização de *Puccinia triticina*, em 48 e 120 hai, em diferentes espécies de Poaceae, na fase de plântula. ASE= apressório sobre estômato, VSE= vesícula sub-estomatal. Porto Alegre, RS. 2011..... 84
47. Produção de compostos autofluorescentes por diferentes espécies de Poaceae, em resposta à tentativa de infecção por *Puccinia triticina*, 120 hai, na fase de plântula. a) Trigo BRS 194, A= 400x, b) Aveia URS 22, A= 400x, c) Cevada BRS 195, A= 200x e d) Arroz Irga 417, A= 200x. Setas indicam a autofluorescência. Porto Alegre, RS. 2011..... 85



48. Proporção de células com autofluorescência associadas a tentativas de penetração e colonização de *Puccinia triticina*, em 48 e 120 hai, em diferentes espécies de Poaceae, na fase de planta adulta. ASE= apressório sobre estômato, VSE= vesícula sub-estomatal. Porto Alegre, RS. 2011..... 86
49. Produção de compostos autofluorescentes por genótipos de trigo, em resposta à tentativa de infecção por *Puccinia triticina*, 120 hai, na fase de planta adulta. a) Toropi, A= 400x, b) *Lr9*, A= 400x Setas indicam a autofluorescência. E= estômato. Porto Alegre, RS. 2011..... 87
50. Proporção de tentativas de penetração de *Puccinia triticina* associadas com a produção de espécies reativas de oxigênio, em diferentes espécies de Poaceae e horas após a inoculação, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011..... 89
51. Produção de espécies reativas de oxigênio por diferentes espécies de Poaceae em resposta à tentativa de infecção por *Puccinia triticina*, na fase de plântula. a) Trigo BRS 194, 120 hai, A= 400x, b) Aveia URS 22, 120 hai, A= 400x, c) Cevada BRS 195, 24 hai, A= 200x, d) Cevada BRS 195, 120 hai, A= 200x, e) Arroz Irga 417, 120 hai, A= 400x e f) Arroz Nippon Bare, 120 hai, A= 400x. Setas indicam o esporo. Porto Alegre, RS. 2011..... 90
52. Proporção de tentativas de penetração de *Puccinia triticina* associadas com a produção de espécies reativas de oxigênio, em diferentes espécies de Poaceae e horas após a inoculação, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011..... 91
53. Produção de espécies reativas de oxigênio por diferentes espécies de Poaceae em resposta à tentativa de infecção por *Puccinia triticina*, na fase de planta adulta. a) Trigo BRS 194, 120 hai, A= 400x, b) Trigo Toropi, 120 hai, A= 400x, c) Trigo Toropi 120 hai, A= 400x, d) Trigo *Lr9*, 120 hai, A= 400x, e) Cevada BRS 195, 120 hai, A= 200x. Setas indicam o esporo. Porto Alegre, RS. 2011..... 92
54. Estruturas infectivas de *Puccinia triticina* em microscopia confocal. a) apressório, vesícula sub-estomatal (VSE), hifa infectiva (HF) e célula mãe-de-haustório (CMH) em aveia URS 22, 120 hai, A= 40x; b) apressório, vesícula sub-estomatal, hifas infectivas e células mãe-de-haustórios em trigo BRS 194, 48 hai, A= 20x. Porto Alegre, RS. 2011..... 95
55. Estruturas infectivas de *Puccinia triticina* e produção de compostos autofluorescentes no genótipo de cevada BRS 195, em microscopia confocal. Apressório, vesícula sub-estomatal (VSE), hifa infectiva (HF), 48 hai, A= 20x. Porto Alegre, RS. 2011..... 96

56. Estruturas infectivas de *Puccinia triticina* no interior dos tecidos do genótipo de trigo BRS 194, em microscopia confocal. a) apressório sobre estômato (ASE), vesícula sub-estomatal (VSE) e intenso crescimento de hifas intercelulares; b) Hifas intercelulares e haustórios, 120 hai, A= 20x. Porto Alegre, RS. 2011..... 96
57. Hifas intercelulares e tecido esporogênico de *Puccinia triticina* no interior dos tecidos do genótipo BRS 194, em microscopia confocal, 120 hai, A= 40x. Porto Alegre, RS. 2011..... 97
58. Reação fenotípica de distintos genótipos de trigo em resposta à inoculação com *Puccinia triticina*, na fase de planta adulta, 15 dias após a inoculação. a) BRS 194, b) Toropi e c) *Lr9*. Porto Alegre, RS. 2011..... 98
59. Comparação da severidade apresentada por distintos genótipos de trigo em resposta à inoculação com *Puccinia triticina*, na fase de planta adulta, 15 dias após a inoculação. a) Toropi e b) BRS 194. Porto Alegre, RS. 2011..... 99
60. Reação fenotípica de resistência de não-hospedeiro do tipo 1 em resposta à inoculação com *Puccinia triticina* nos genótipos de cevada a) BRS 195 e de arroz b) Irga 417 e c) Nippon Bare, na fase de planta adulta, 15 dias após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2011..... 99
61. Reação de suscetibilidade em resposta à inoculação com *Puccinia triticina* no genótipo de trigo BRS 194, na fase de plântula, 15 dias após a inoculação. a) Pústulas de suscetibilidade; b) Pústulas com tipo de infecção 3 c) Pústula que rompeu a epiderme, expondo esporos, vista sob microscópio estereoscópio. A= 6,3x; d) Pústulas coalescidas. A= 6,3x. Porto Alegre, RS. 2011..... 100
62. Reação fenotípica à inoculação com *Puccinia triticina* nos genótipos de trigo a) BRS 194, de cevada b) BRS 195, de aveia c) URS 22 e de arroz d) Irga 417 e e) Nippon Bare, na fase de plântula, 15 dias após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2011..... 101
63. Reação de resistência de não-hospedeiro do tipo 2 em resposta à inoculação com *Puccinia triticina* no genótipo de cevada BRS 195, na fase de plântula, 15 dias após a inoculação. a) Pústulas de resistência na ponta da folha; b) Pústulas com tipo de infecção 1 e 2; c) Pústula recoberta pela epiderme, vista sob microscópio estereoscópio. A= 6,3x; d) Pústula de tamanho diminuto com borda clorótica. A= 8x. Porto Alegre, RS. 2011..... 102

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial traz à tona um desafio crescente: aumentar a produção de alimentos de forma sustentável, minimizando os impactos ao ambiente. Grande parte da alimentação humana baseia-se em cereais. No entanto, um dos fatores limitantes à produção de cereais no mundo são as doenças. Dentre estas, as ferrugens causadas pelos fungos do gênero *Puccinia* são de extrema importância, pois reduzem o rendimento dos principais cereais cultivados.

Os fungos causadores de ferrugens são biotróficos e, como parasitas obrigatórios, co-evoluíram com seus hospedeiros, diferenciando-se em *formae specialis*. Assim, a maioria das espécies de ferrugem pode infectar somente uma ou poucas espécies de gramíneas. O arroz é uma exceção, pois apesar de ser amplamente cultivado, é o único cereal imune aos patógenos causadores de ferrugens. Ainda não se sabe exatamente quais fatores determinam a gama de patógenos capazes de atacar determinado hospedeiro e por que o arroz não é afetado por nenhuma espécie de ferrugem.

As plantas possuem eficientes sistemas de detecção e de resposta à infecções por microrganismos. Assim, podem exibir mecanismos de resistência de natureza distinta, pré-existentes ou induzidos após o reconhecimento do patógeno, mobilizando defesas bioquímicas e estruturais. Em patossistemas envolvendo ferrugens, a resistência

geralmente é classificada como sendo específica ou não-específica a raças, podendo envolver mecanismos pré e/ou pós-haustoriais.

A resistência que tem se mostrado durável para ferrugens dos cereais geralmente é governada por vários genes de pequeno efeito sobre o desenvolvimento do patógeno, não envolvendo mecanismos de hipersensibilidade. Acredita-se que o efeito destes genes pode ser aumentado quando em combinação com outros genes, incluindo os de resistência raça-específica.

Muitos autores consideram a resistência de não-hospedeiro como uma estratégia promissora na busca de cultivares com resistência durável em espécies hospedeiras, visto que muitos mecanismos de resistência podem ocorrer de forma similar entre as diferentes espécies. O conhecimento de como a infecção é paralisada em cereais não-hospedeiros, a exemplo do arroz, que é imune e mesmo em espécies economicamente importantes que são afetadas por ferrugens, como cevada e aveia, pode auxiliar no entendimento das interações entre patógenos e hospedeiros, além de fornecer subsídios para que estes mecanismos sejam explorados e combinados em espécies hospedeiras.

Apesar dos avanços recentes no conhecimento atual a respeito das interações patógeno-hospedeiro, acredita-se que ainda existam diversos mecanismos de resistência inexplorados. Num contexto evolucionário, toda resistência é transitória. Tem-se assim, a necessidade constante de ampliação dos mecanismos de defesa em genótipos comerciais. Desta forma, a observação e investigação acurada de diferentes tipos de reação às ferrugens poderão resultar na descoberta de mecanismos de resistência atuando em diferentes estágios do processo infeccioso. Quando combinados, estes mecanismos podem fornecer às plantas múltiplas barreiras à infecção. Ainda, o estudo detalhado sobre as bases histológicas e genéticas dos mecanismos de resistência poderá

gerar informações valiosas a respeito dos fenômenos mais promissores a estudar fisiológica e bioquimicamente.

O conhecimento dos diferentes mecanismos responsáveis pela resistência aos patógenos causadores de ferrugens pode representar possibilidades adicionais para uma melhor exploração do germoplasma de espécies hospedeiras de importância econômica e também, de espécies relacionadas, visando o acúmulo de vários mecanismos em um único genótipo. Além disso, esse conhecimento pode ser útil para a identificação dos genes envolvidos neste processo, auxiliando no desenvolvimento de marcadores moleculares mais eficientes para seleção assistida.

Neste contexto, a identificação dos mecanismos que determinam a resistência às ferrugens dos cereais em espécies hospedeiras e não-hospedeiras é de extrema importância, pois pode fornecer subsídios ao melhoramento genético visando à obtenção de formas de resistência mais duráveis em espécies economicamente importantes. Assim, os objetivos deste trabalho foram:

## **1.2 OBJETIVO GERAL**

Caracterizar os eventos histológicos responsáveis pela reação de resistência em interações de hospedeiro e não-hospedeiro, em patossistemas *Puccinia triticina* x Poaceae.

### **1.2.1 Objetivos específicos**

- 1-** Caracterizar no tempo e no espaço os eventos histológicos envolvidos nas reações de suscetibilidade e resistência de hospedeiro dos tipos específica à raça e não-específica à raça e de não-hospedeiro, em resposta à infecção por

*Puccinia triticina*, identificando eventos interrompidos e alterados durante estes processos.

**Hipótese 1:** Existem diferenças espaciais e temporais nas respostas à infecção por *P. triticina* entre genótipos hospedeiros (trigo) suscetível e com diferentes tipos de resistência e espécies não-hospedeiras.

2- Caracterizar os eventos histológicos envolvidos na reação de resistência não específica à raça expressa na cultivar de trigo Toropi em resposta à infecção por *P. triticina*, identificando sua natureza (estrutural e/ou bioquímica; pré-existente e/ou induzida) e os mecanismos que a governam (pré ou pós-haustoriais).

**Hipótese 2:** Mecanismos de resistência pré-haustoriais de natureza não hipersensível são expressos durante o processo de infecção de Toropi por *P. triticina*, refletindo-se na durabilidade da sua resistência.

3- Caracterizar os eventos histológicos envolvidos nas reações de resistência de não-hospedeiro de cevada, aveia e arroz à *P. triticina*, identificando sua natureza (estrutural e/ou bioquímica; pré-existente e/ou induzida) e os mecanismos que a governam (pré ou pós-haustoriais).

**Hipótese 3:** Distintos mecanismos de resistência à *P. triticina* podem estar presentes nos diferentes cereais. No entanto, a durabilidade das resistências observadas nas interações de não-hospedeiro e de hospedeiro do tipo não-específica à raça pode estar de alguma forma, relacionada.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Interações patógeno-hospedeiro entre *Puccinia* x *Poaceae*

Os patógenos responsáveis pelas ferrugens em hospedeiros da família *Poaceae* são fungos do filo Basidiomycota, classe Urediniomycetes, ordem Uredinales, família Pucciniacea e atuam como parasitas obrigatórios. As relações patógeno-hospedeiro são específicas em nível de espécie (*formae specialis*) e também de variedades (raças fisiológicas). São fungos heteroécios e policíclicos, completando cada ciclo entre 7 e 10 dias (Roelfs *et al.*, 1992; Agrios, 2005; Webster & Weber, 2007).

No Brasil, a ferrugem da folha do trigo, causada por *Puccinia triticina* Erikss. é autoécia, ou seja, não apresenta fase sexual, pela ausência de hospedeiro alternativo, desenvolvendo-se em apenas um hospedeiro durante seu ciclo de vida. Os teliósporos (esporos de descanso) são encontrados em tecidos senescidos, porém, não constituem inóculo aos cereais de inverno, somente ao hospedeiro alternativo, que não é encontrado no Brasil (Martinelli, 2000; Reis *et al.*, 2001).

Cada fase do ciclo de vida das ferrugens é marcada por propriedades fisiológicas e morfológicas únicas. Estes fungos podem apresentar até cinco estádios em seu ciclo de vida. A fase uredial, responsável pela doença nos cereais é iniciada pela germinação de um uredosporo, o que ocorre em condições de alta umidade, quando um filme de água, geralmente proveniente de orvalho, cobre a superfície da folha (Harder & Haber, 1992; Heath, 1997; Roderick, 2003).

A germinação do uredosporo resulta na formação de um tubo germinativo. Os estômatos das folhas dos cereais ocorrem em fileiras e suas posições variam entre diferentes linhas, assim tubos germinativos de *Puccinia graminis* f.sp *tritici* Pers. (ferrugem do colmo do trigo) crescem preferencialmente em sentido perpendicular às nervuras da folha, a fim de maximizar as chances de localizar um estômato. Quanto mais energia gasta é no crescimento do tubo germinativo menores são as chances de se estabelecer uma colônia vigorosa uma vez que, até a formação de haustórios, todo crescimento fúngico depende somente das reservas presentes no esporo (Niks, 1990; Read *et al.*, 1992).

Os tubos germinativos de *Hemileia vastatrix* Berk. aparentemente não possuem uma direção de crescimento, tanto em folhas de hospedeiros como de não hospedeiros (Coutinho *et al.*, 1993). Para explicar isso, Wynn (1976) propõe que o crescimento aleatório dos tubos germinativos pode ser em decorrência da ausência de forte adesão entre estes e a superfície da folha. Ferreira & Rijkenberg (1989) observaram que os tubos germinativos de *Uromyces transversalis* Thüm. que falham em localizar o estômato, geralmente alcançam um comprimento considerável. Há uma correlação negativa entre o comprimento do tubo germinativo de *P. hordei* Otth. em cevada e o estabelecimento de lesões. A formação de longos tubos germinativos e, adicionalmente, tubos germinativos muito ramificados, parece reduzir a energia disponível para infectar a planta. Em trigo, uredosporos de *P. triticina* localizados próximos à abertura dos estômatos podem formar apressórios sem formação aparente de tubo germinativo, ou tubos germinativos bem curtos, enquanto uredosporos com tubos germinativos muito longos parecem falhar na formação de apressórios (Hu & Rijkenberg, 1998).

Os tubos germinativos de *Puccinia* spp. possuem grande capacidade de perceber os sinais físicos da superfície foliar dos hospedeiros (Allen *et al.*, 1991; Read *et al.*,



1992). De 91-99% dos tubos germinativos formados por *P. graminis* e *P. hordei* formam apressórios ao encontrar o estômato da planta. Ao testar um substrato artificial, Read *et al.* (1997), demonstraram que 83-86% dos tubos germinativos formados por estas espécies são induzidos a formar apressórios somente através de sinais topográficos. Sugere-se que o tubo germinativo seja capaz de perceber as características topográficas do complexo estomático, como a posição e o espaçamento das células adjacentes aos estômatos, bem como à forma e tamanho destes nos diferentes cereais e, assim, induzir a formação de apressórios (Collins & Read, 1997; Staples, 2000; O'Connell & Panstruga, 2006).

Além dos sinais físicos, sinais químicos da folha, como ceras epicuticulares, o gradiente de pH ao redor do estômato e compostos voláteis liberados pelos estômatos, influenciam na formação de apressórios. Collins *et al.* (2001) ao isolar estímulos físicos (indução em substratos artificiais) e químicos (via aplicação de compostos voláteis liberados pelos estômatos) na indução da formação de apressórios de *P. graminis* f. sp. *tritici*, relataram uma taxa de formação de cerca de 60%, 12h após a inoculação. Quando avaliaram o efeito combinado dos sinais este valor aumentou para quase 90%, demonstrando a importância de ambos na diferenciação de apressórios.

Outras características diferenciadas parecem induzir a formação de apressórios em não hospedeiros, resultando em altas taxas de formação longe dos estômatos (Heath, 2000). No entanto, o papel dos sinais topográficos e físicos na indução de apressórios em ferrugens não é bem claro e muitas vezes, mesmo em plantas hospedeiras, os apressórios formam-se em células da epiderme e não sobre os estômatos (Read *et al.*, 1997).

A formação de apressórios é crítica no processo infectivo, pois é através destes que a maioria dos fungos causadores de ferrugens penetra no interior do tecido do

hospedeiro. Porém, existem exceções como *P. striiformis* Westend., que pode penetrar com o tubo germinativo diretamente pelo estômato e o fungo causador da ferrugem da soja, *Phakopsora pachyrhizi* Sidow., que penetra diretamente sobre a cutícula da planta, com formação de apressório (Collins & Read, 1997; Staples, 2000; Moldenhauer *et al.*, 2006; Zambenedetti Magnani *et al.*, 2007).

Após a penetração do fungo na câmara sub-estomática, forma-se uma vesícula sub-estomatal e uma hifa infectiva. Em trigo, este processo ocorre cerca de 6h após a inoculação com *P. triticina* (Hu & Rijkenberg, 1998). As hifas infectivas, ao entrarem em contato com a parede celular de células do mesófilo da planta diferenciam-se em células-mãe-de-haustório, cerca de 12h após a inoculação. Estas formam um grampo estreito e penetram a parede celular hospedeira, provavelmente por dissolução enzimática e pressão. No espaço periplasmático, uma célula especializada expande-se formando o haustório, cerca de 24h após inoculação (Figura 1).

A partir daí inicia-se o crescimento de hifas intercelulares, até que uma colônia fúngica forme-se dentro do tecido hospedeiro. Sugere-se que a hifa infectiva é capaz de absorver nutrientes antes da formação do primeiro haustório, esta absorção limita-se a alguns aminoácidos. A absorção de carboidratos é feita somente pelos haustórios, que repassam os mesmos para a hifa celular (Heath, 1981; Harder & Haber, 1995; Heath, 1997; Hu & Rijkenberg, 1998; Struck *et al.*, 2002; Leonard & Szabo, 2005).

O haustório desenvolve-se dentro do lúmen, mas permanece fora da membrana plasmática da célula do hospedeiro. A interface formada entre planta e patógeno compreende a membrana plasmática da planta e a parede celular do fungo, uma membrana interfacial derivada da planta (membrana extra-haustorial) e uma matriz interfacial (matriz extra-haustorial) que separa a membrana interfacial da parede celular do fungo (O'Connell & Panstruga, 2006).

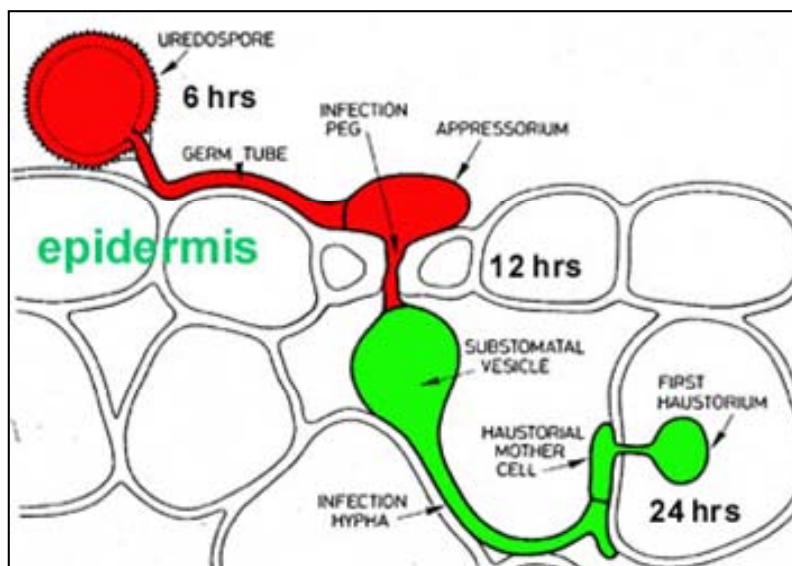


FIGURA 1. Diferenciação temporal das estruturas de infecção de *Uromyces fabae* Pers. Fonte: <http://www.botany.ubc.ca/bakkeren/rust%20infection%20process.htm>.

A formação de haustórios é um elemento chave para manutenção da vida dos organismos biotróficos, facilitando sua interação com a célula hospedeira. Estes desempenham função não só na aquisição de nutrientes, mas também nas vias biossintéticas, supressão de defesas do hospedeiro, redirecionamento e reprogramação de metabólitos da planta (Voegelé *et al.*, 2001; Voegelé & Mendgen, 2003). Após a formação do primeiro haustório, a hifa infectiva desenvolve outras células-mãe-de-haustórios. A energia para produção dos primeiros haustórios provém de reservas presentes nos uredosporos. O desenvolvimento de haustórios subsequentes dependerá do estabelecimento de uma interação compatível de parasitismo (Szabo & Bushnell, 2001; Panstruga, 2003; Leonard & Szabo, 2005).

Em interações compatíveis, a formação de colônias está associada à formação de tecido esporogênico, um tecido altamente vacuolizado e rico em lipídios que dará origem aos esporos (Harder, 1976). A colonização pode ser facilitada pela produção de fitotoxinas e compostos semelhantes a hormônios vegetais por parte do patógeno (Harder & Haber, 1992; Harder & Haber, 1995; Heath, 1997).

A planta, por sua vez, ao perceber o patógeno, tenta impedir sua entrada através do rearranjo celular, o que inclui reorganização do citoesqueleto (filamentos de actina) e movimentação de organelas, levando à polarização celular no local de ataque (deposição de material fibrilar). Esta polarização pode levar à formação de reforços na parede celular, chamados de papilas, que funcionam como barreiras químicas e físicas contra a penetração do patógeno. Ainda, podem incluir o desenvolvimento de colares de calose ao redor do pescoço do haustório ou encapsulamento do mesmo pela síntese contínua deste material (Heath, 1981; Schmelzer, 2002; Zeyen *et al.*, 2002; Lipka & Panstruga, 2005; O'Connell & Panstruga, 2006).

O desenvolvimento e estabelecimento da doença são dependentes de uma série de fatores. Em plantas não-hospedeiras ou resistentes, a infecção será bloqueada pela ativação do sistema imune primário e secundário, através do reconhecimento de PAMPs (padrões moleculares associados à patógenos) ou efetores, resultando em resistência. Nas plantas suscetíveis os mecanismos de resistência são superados por efetores produzidos pelo patógeno. Estes podem não ser reconhecidos ou então, são capazes de inativar as respostas de defesa da planta, através da manipulação das rotas expressas na resistência (Chisholm *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006; Bent & Mackey, 2007).

Em casos de interação compatível entre planta e patógeno, depois de 7-10 dias, a esporulação tem início. Os esporos rompem a cutícula formando pústulas (Figura 2). A massa de uredosporos presentes no centro das frutificações confere às pústulas uma coloração laranja-amarelada. Estas são arredondadas e distribuem-se em ambas as superfícies da lâmina foliar (Harder & Haber, 1992).

Quando as plantas infectadas amadurecem (final da estação) é cessada a formação de uredosporos e inicia-se a formação de teliosporos. A ontogenia dos teliosporos é a mesma dos uredosporos, porém, os teliosporos permanecem sésseis. As

pústulas tornam-se de coloração pardo-escuras ou negras e permanecem recobertas pela epiderme (Harder & Haber, 1992; Harder & Haber, 1995). Estes esporos também são formados durante condições adversas de temperatura, como seca, umidade excessiva ou temperaturas muito altas, mas não são fonte de inóculo para novas infecções nas condições brasileiras, pois o hospedeiro alternativo suscetível (*Thalictrum speciosissimum* L.) não é encontrado no Brasil.

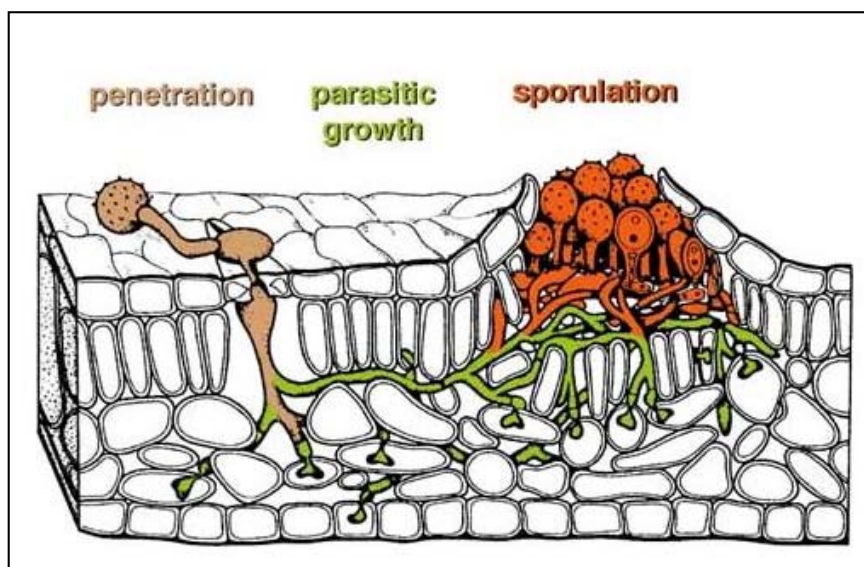


FIGURA 2. Processos de penetração, crescimento e esporulação de *Uromyces fabae*.  
Fonte: <http://www.science.org.au/events/frontiers/frontiers2008/dodds.html>.

As ferrugens induzem diversas mudanças estruturais, bioquímicas e fisiológicas no hospedeiro, porém, é difícil distinguir as alterações primárias, diretamente induzidas pelo fungo, das alterações relacionadas com processos secundários, como indução da senescência e desorganização celular. O dano se manifesta nas alterações secundárias (Harder & Haber, 1992).

São descritas duas fases distintas de resposta do hospedeiro à infecção pelo fungo, a fase juvenil e a fase autolítica (Durbin, 1984). Na fase juvenil, a planta o protoplasto celular está fisiologicamente novo, o sítio de infecção atua de maneira que haja um desvio de solutos do hospedeiro para este local, afetando os processos normais

da planta distantes deste sítio. O fluxo normal do floema é alterado, direcionando o fluxo de nutrientes para as regiões infectadas. A fase autolítica inicia-se depois de cerca de dez dias, quando as células hospedeiras do centro das colônias tornam-se desorganizadas, as organelas começam a desaparecer e o tecido hospedeiro perde solutos. Estes sintomas assemelham-se ao da senescência normal, que é acelerada em plantas infectadas por ferrugem (Harder & Haber, 1992, Leonard & Szabo, 2005).

Se uma planta jovem é severamente atacada pela ferrugem da folha, há um reflexo na habilidade de crescimento e reprodução da planta. Os meristemas vegetativos, reprodutivos e as raízes tornam-se incapazes de se desenvolver normalmente. Ataques severos podem levar a planta à morte (Dinoor *et al.*, 1988; Roelfs *et al.*, 1992).

A esporulação do fungo resulta na ruptura da epiderme da planta, causando um aumento dramático na perda de água pela planta, que não consegue controlar a evaporação, além de perder água contida nos uredosporos liberados. O efeito da perda de água impede o desenvolvimento normal das raízes, apressando a senescência, o que resulta em redução no rendimento e na qualidade de grãos (Dinoor *et al.*, 1988; Harder & Haber, 1992).

O dano causado às folhas provoca redução na fotossíntese, interferindo na translocação dos produtos resultantes deste processo, das folhas para o grão em formação. Há também redução nas trocas gasosas da folha, acarretando em grãos murchos, com pouco ou nenhum valor comercial e nutricional.

## **3.2 Natureza da resistência nas interações *Puccinia* x *Poaceae***

### **3.2.1 Resistência de hospedeiro**

A resistência é definida como a habilidade do hospedeiro em retardar ou impedir o crescimento e desenvolvimento do patógeno (Parlevliet, 1997). Na maioria dos patossistemas *Puccinia* x *Poaceae* a resistência é dominante e a suscetibilidade recessiva (Dinoor *et al.*, 1988).

As populações hospedeiras de fungos biotróficos geralmente são altamente polimórficas para resistência e suscetibilidade aos isolados das espécies adaptadas de patógenos. Para ferrugens, essas populações vêm sendo classificadas como resistentes, moderadamente resistentes, suscetíveis e moderadamente suscetíveis (McIntosh *et al.*, 1995). A resistência pode ser descrita de diferentes formas e alguns conceitos se sobrepõem. Quanto ao modo de herança, esta pode ser monogênica, oligogênica, poligênica, de gene maior ou gene menor; com base na especificidade das relações patógeno/hospedeiro é considerada específica à raça ou não específica à raça; quanto à presença ou ausência de reações no hospedeiro, ativa ou passiva; com base na expressão da resistência é total, parcial, residual, de campo, de plântula, de planta adulta ou geral; e o seu mecanismo pode ser de hipersensibilidade ou não (Nelson, 1973; Parlevliet, 1997).

A resistência total geralmente é associada à reação de hipersensibilidade (RH), que consiste na morte celular localizada no local de infecção, após a percepção da violação da parede celular e tentativa de formar haustórios. Esta resistência é baseada na teoria gene-a gene, de Flor, através da interação de genes de resistência no hospedeiro e genes de avirulência no patógeno (Ellis, 2006). A variação na resistência de hospedeiros geralmente é controlada pela segregação de um único gene de resistência, cujo produto

interage direta ou indiretamente com elicitores específicos produzidos pelos patógenos e codificados por genes de avirulência (Heath, 2000).

As interações específicas entre patógeno e hospedeiro são usualmente relatadas nos casos de resistência monogênica ou oligogênica e fundamentadas na teoria gene-a-gene, relacionando-se com a reação de hipersensibilidade. Há uma interação cultivar x raça. Nas interações não-específicas, todas as raças provocam respostas similares em determinado genótipo hospedeiro, ou seja, a resistência é efetiva contra todas as raças do patógeno, sem interação cultivar x raça e usualmente poligênica (Roelfs & McVey, 1979; Harder & Haber, 1992; Ribeiro do Vale *et al.*, 2001).

Baseando-se no número de genes envolvidos (magnitude dos efeitos de cada gene), a resistência pode ser classificada como monogênica (qualitativa) ou poligênica (quantitativa). Na resistência monogênica um único gene é suficiente para conferir resistência (o efeito de um gene pode ser isolado). As plantas são suscetíveis ou resistentes, não há reações intermediárias, gerando uma distribuição fenotípica descontínua (Ribeiro do Vale *et al.*, 2001). Por ser efetiva apenas contra algumas raças do patógeno, age no sentido de reduzir a quantidade efetiva de inóculo inicial virulento, fazendo com que o início da epidemia seja atrasado (Camargo, 1995).

Na resistência poligênica (quantitativa), vários genes são necessários para conferir resistência suficiente, em um efeito conjunto. Todos os isolados provocam respostas similares em determinados genótipos do hospedeiro. Há uma variação contínua nos graus de resistência, indo desde extrema suscetibilidade, até extrema resistência. Para que seja possível distinguir os genótipos resistentes dos suscetíveis é necessário quantificar a doença, já que a distinção entre estes não é tão evidente como na resistência qualitativa (Ribeiro do Vale *et al.*, 2001).



Nesta resistência, que é efetiva contra todas as raças do patógeno, há uma redução na taxa de desenvolvimento da doença, sem afetar significativamente o inóculo inicial, pelo menor tamanho de lesões e aumento do período latente (Camargo, 1995).

Em cereais de inverno, a resistência raça-específica não oferece proteção adequada contra a ferrugem da folha, já que novas raças de virulência do patógeno surgem alguns anos após a liberação de cultivares com este tipo de resistência (Leonard, 2002).

Atualmente, há uma tendência por parte dos melhoristas, em identificar cultivares com resistência mais durável. A resistência qualitativa (raça-específica) exerce maior pressão de seleção sobre a população patogênica do que a resistência quantitativa (parcial). No entanto, a durabilidade da resistência não depende apenas da especificidade da mesma, e está intimamente relacionada com o mecanismo de ação dos genes de resistência, com o estilo de vida do patógeno, biotrófico ou necrotrófico, bem como com o seu potencial evolutivo, ou seja, seu tipo de reprodução, número de gerações por estação de cultivo e mecanismos de dispersão utilizados (Johnson, 1984; Parlevliet, 1997; Ribeiro do Vale *et al.*, 2001; Niks & Rubiales, 2002; McDonald & Lindle, 2002; Singh *et al.*, 2005; Bent & Mackey, 2007).

### **3.2.2 Resistência de não-hospedeiro**

Apesar de estarem constantemente expostas a microrganismos, as plantas possuem resistência à sua grande maioria. Essa resistência é chamada de resistência de não-hospedeiro e é mantida pela combinação de mecanismos passivos e ativos de defesa. Durante a evolução entre plantas e organismos patogênicos, alguns patógenos adquiriram a habilidade de inativar os mecanismos de resistência de não-hospedeiro e tornaram-se capazes de reproduzirem-se em espécies de plantas em particular. Por outro

lado, sob intensa pressão de seleção, as plantas desenvolveram novas formas de resistência, desenvolvendo genes de resistência contra determinadas raças de patógenos compatíveis. A resistência de hospedeiros, ao contrário da resistência de não-hospedeiros, é patógeno-específica e restrita a determinadas espécies e genótipos de patógenos (Heath, 2000; Neu *et al.*, 2003).

A resistência de não-hospedeiro está sendo considerada como um dos mecanismos mais promissores no desenvolvimento de cultivares com resistência durável à ampla gama de patógenos. O que determina a gama de hospedeiros de determinado patógeno ainda é uma questão fundamental e intrigante no entendimento da biologia patógeno-hospedeiro.

Sabe-se que patógenos possuem padrões moleculares conservados (PAMPs) capazes de induzir o sistema imune primário de defesa em hospedeiros e não-hospedeiros. Na membrana celular da planta existem receptores que reconhecem estes PAMPs e ativam as respostas de defesa primárias da planta, como alterações na parede celular e acúmulo de proteínas relacionadas à defesa: quitinases, glucanases, proteases, além de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estes afetam negativamente a colonização pelo patógeno em potencial (Chisholm *et al.*, 2006; Bent & Mackey, 2007; de Wit, 2007).

Em resposta às defesas primárias da planta, os patógenos produzem efetores (fatores de virulência) que podem impedir a sinalização de resistência que ocorre via cascatas MAP-quinases e ativação de fatores de transcrição. Desta forma, a infecção é garantida. A co-evolução entre plantas e organismos patogênicos fez com que as plantas desenvolvessem proteínas de resistência (R), capazes de reconhecer e bloquear a atividade destes efetores, restaurando a resistência via sistema imune secundário. Neste sentido, os patógenos tentam impedir o reconhecimento de seus efetores pelas proteínas

R, através de mutações ou deleções em partes do efetor que não sejam essenciais para virulência (Chisholm *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006; Bent & Mackey, 2007; de Wit, 2007).

Na resistência de não-hospedeiro os PAMPs de determinado patógeno são prontamente reconhecidos pelos receptores na membrana celular das plantas. Embora o patógeno produza efetores para tentar suprimir as respostas de defesa primárias, estes podem não ser efetivos em determinadas espécies de plantas, através da ação das proteínas R, tornando-as não-hospedeiras para este patógeno (Lipka *et al.*, 2005; Bent & Mackey, 2007).

Nos últimos anos foram feitos vários avanços quanto ao entendimento da resistência de não hospedeiro. Nenhum tipo de ferrugem ataca *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.), mas esta planta vem sendo estudada como modelo na caracterização da sinalização de resistência de não-hospedeiro em diversas interações, incluindo a ferrugem da ervilha (*U. viciae* Barclay). A resistência de arabidopsis às ferrugens envolve primeiramente, pela expressão de genes de defesa, a restrição no crescimento da hifa infectiva, antes da formação do primeiro haustório. Há um subsequente envolvimento do ácido salicílico (AS), mas não de genes relacionados à patogênese e dependentes de AS (Mellersh & Heath, 2003).

As defesas pré-formadas exercem importante papel na resistência de não-hospedeiro, principalmente em espécies não domesticadas. Estas defesas incluem a presença de metabólitos secundários, peptídeos e proteínas, que são um empecilho à infecção por determinados patógenos. Acredita-se que estes compostos tenham evoluído em resposta à pressão seletiva imposta por herbívoros, patógenos e até mesmo, estresses abióticos (Heath 1997; Heath 2000).

Embora a reação de hipersensibilidade (RH) seja mais comum na expressão de resistência de hospedeiro, também pode ocorrer na resistência de não-hospedeiro. Na maioria dos casos, não há manifestação de nenhum sinal macroscópico de infecção. Com base nisto, a resistência de não-hospedeiro pode ser classificada de duas formas: tipo 1 – sem produção de sintomas ou sinais visíveis; tipo 2 – associada com RH rápida e localizada. Os genes responsáveis por estas duas formas ainda não foram intensamente investigados. No entanto, sugere-se que o tipo 1 de resistência de não-hospedeiro atue num mecanismo mais ativo de defesa, contra ampla gama de patógenos (Heath, 2000; Oh *et al.*, 2006).

Em arábida, a resistência de não-hospedeiro a *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (oídio da cevada) pode ocorrer em duas fases. Na fase pré-haustorial os esporos germinam e formam apressórios, ocorre penetração na parede celular e o crescimento da hifa é bloqueado pela produção de papila em 90% dos sítios de infecção. Durante a fase pós-haustorial, os haustórios que se formaram nos sítios de infecção restantes são encapsulados por calose, resultando em RH. O mais comum parece ser a ativação da resistência de não-hospedeiro antes da formação de haustórios (pré-haustorial) e sem RH (Ellis, 2006).

Os sinais para desencadear a resistência de não-hospedeiro podem ser: a pressão exercida pelo grampo de penetração; padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), que variam desde quitina e ergosterol até a percepção da subunidade protéica do flagelo de bactérias; e sinais resultantes da degradação da célula hospedeira (Lipka & Panstruga, 2005; Ellis, 2006).

Embora as ferrugens sejam organismos extremamente especializados, sob condições especiais, pode haver um crescimento limitado de *P. triticina* em cevada (Niks *et al.* 1996). Assim, a cevada pode ser considerada um hospedeiro ocasional e *P.*

*tritricina* um patógeno inapropriado. A resistência neste caso pode envolver mecanismos pré e pós-haustoriais (Neu *et al.*, 2003). O estudo dos mecanismos de resistência envolvidos nesta interação patógeno-hospedeiro ocasional pode auxiliar no entendimento das reações de resistência tanto em hospedeiros, como em não-hospedeiros.

Recentemente foram identificados genes que mediam a resistência de não-hospedeiro em cevada. Dois genes putativos parecem mediar a resistência à *P. tritricina*, sendo que um deles só é induzido em caso de sucesso na infecção com o não-patógeno (Neu *et al.*, 2003). Sugere-se que os genes envolvidos nos mecanismos de resistência de não-hospedeiros possuam funções diferentes dos genes envolvidos em interações patógeno-hospedeiro, indicando a presença de diferentes rotas de sinalização entre estes dois mecanismos (Holub & Cooper, 2004). Porém, a análise de mutantes de fumo e *arabidopsis* revelou que a sinalização para resistência de não hospedeiro do tipo 2 e a sinalização de hospedeiro podem sobrepor-se em determinados momentos da rota (Peart *et al.*, 2002; Yun *et al.*, 2003).

Jafary *et al.* (2006) desenvolveram um modelo evolucionário baseando-se nas interações cevada x *Puccinia*, afim de estudar a herança e a especificidade dos fatores que determinam o quanto a resistência de não-hospedeiro pode ser suprimida. Fez-se o cruzamento entre uma linhagem de cevada apresentando extrema suscetibilidade à diferentes espécies de ferrugem, com a cultivar Vada, possuidora de resistência de planta adulta (RPA). Verificou-se que para cada espécie de ferrugem, um grupo diferente de genes foi efetivo. Sete regiões cromossômicas distintas foram efetivas para mais de uma espécie de ferrugem, indicando ligação genética ou pleiotropia entre estas. Um gene de resistência (R) baseado em RH à *P. hordei-secalini* foi mapeado, sugerindo a contribuição ocasional de um gene *R* para a resistência de não-hospedeiro. Esta

hipótese também foi levantada por Bent & Mackey (2007). Os QTLs (*loci* de caracteres quantitativos) identificados por Jafary *et al.* (2006) possuem papel importante como fatores específicos e quantitativos de reconhecimento, sendo especificamente anulados por ferrugens, a fim de suprimir a imunidade inata e garantir o sucesso na infecção.

Análises histológicas da infecção de diferentes linhagens de arroz por *P. graminis* f. sp. *tritici* demonstraram que pode haver algum crescimento do patógeno no interior dos tecidos da planta (Ayliffe *et al.*, 2011). No entanto, o mecanismo de resistência envolvido nesta interação não é conhecido e várias hipóteses são especuladas, dentre elas, o acúmulo de calose em resposta à tentativa de infecção.

Recentemente, o desenvolvimento de técnicas moleculares permitiu o sequenciamento de todo o genoma do arroz (Goff *et al.*, 2002). A análise comparativa de genomas de diferentes cereais tem revelado grandes similaridades entre estes, com conservação de diversos genes (colinearidade) (Bennetzen & Ma, 2003). Embora o arroz não seja atacado por nenhuma espécie de ferrugem, especula-se que haja relação entre alguns QTLs para resistência às ferrugens entre cevada, trigo, aveia e arroz. Acredita-se desta forma, que o entendimento da resistência de não-hospedeiro poderá auxiliar na obtenção de formas mais duráveis de resistência em plantas hospedeiras (Perovic *et al.*, 2004).

### **3.3 Componentes histopatológicos da resistência nos patossistemas *Puccinia* x Poaceae**

Estudos histológicos da interação entre *Puccinia* x Poaceae demonstraram que dois tipos básicos de resistência podem ser distinguidos: mecanismos pré-haustoriais e pós-haustoriais. Em grande parte dos patossistemas envolvendo ferrugens, a germinação de uredosporos e formação de apressórios são eventos independentes do genótipo do

hospedeiro. No entanto, uma vez que o apressório e a vesícula sub-estomatal estejam formados, os genótipos irão diferir na extensão em que mecanismos pré ou pós-haustoriais atuarão (Heath, 1981; Niks & Rubiales, 2002).

A resistência pré-haustorial é ativada antes da formação do primeiro haustório. Geralmente ocorre o desenvolvimento normal das células-mãe-de-haustórios, mas há indução de papila no local de penetração, paralisando o crescimento do fungo, sem ocasionar necrose celular. Este tipo de resistência é comum em interações de não-hospedeiros, como na resistência de cevada à ferrugem da folha do centeio, de trigo à ferrugem da folha da cevada, e de *Medicago truncatula* Gaertn. à ferrugem da alfafa (*U. striatus*). No entanto, também pode ocorrer em casos de interação entre patógeno x hospedeiro, à exemplo de linhagens com resistência parcial à ferrugem da folha da cevada. Em trigo, a resistência à ferrugem da folha pode variar desde pré-haustorial, sem ocorrência de necrose, até pós-haustorial, com necrose frequente. Esta variação parece depender mais da genealogia da planta do que do isolado de ferrugem (Niks, 1989; Niks & Dekens, 1991; Rubiales & Moral, 2004).

Acredita-se que a resistência pré-haustorial seja desencadeada pela combinação de diversos mecanismos de defesa na planta, afetando negativamente a colonização por parte do patógeno. Desta forma, sugere-se que esta seja uma forma de resistência mais durável em interações patógeno x hospedeiro (Heath, 1981; Niks & Dekens, 1991; Heath, 2000).

Um exemplo da durabilidade desta resistência é o gene *mlo*, que confere resistência pré-haustorial à *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* em cevada. Este gene é efetivo contra todas as raças do patógeno e media a resistência através da rápida formação de uma papila no local de penetração. Neste caso, há ocorrência de reação de hipersensibilidade, levando a célula à necrose. No entanto, a morte celular é exceção e

não a regra em casos de mecanismos pré-haustoriais de resistência. Normalmente, a única reação visível em microscopia é a presença de deposições na parede celular do hospedeiro (papilas), que atuam como barreira à penetração do fungo. Estas papilas se formam entre a célula-mãe-de-haustório e a célula hospedeira e estão associadas à paralisação da infecção (Niks & Dekens, 1991; Jørgensen, 1992).

Os patógenos de modo geral, produzem elicitores a fim de tentar suprimir as respostas de defesa da planta. No entanto, quando estes são reconhecidos através das proteínas de resistência da planta, há um bloqueio do crescimento do patógeno, anterior à formação de haustórios, resultando em resistência pré-haustorial (Niks & Rubiales, 2002; Bent & Mackey, 2007; de Wit, 2007).

Na resistência pós-haustorial o crescimento do fungo é paralisado após a formação de pelo menos um haustório. Neste caso, a célula ou células que possuem haustórios morrem, num mecanismo conhecido como hipersensibilidade. Grande parte da resistência às ferrugens baseia-se em genes de efeito maior (raça-específicos) com mecanismos pós-haustoriais. Desta forma, a evolução e seleção de raças capazes de superar esta resistência são mais comuns (Heath, 1981; Niks & Dekens, 1991). A reação de hipersensibilidade é a forma mais comum de resistência pós-haustorial. Este fenômeno não é uniforme e pode diferir ultra-estruturalmente e bioquimicamente entre diferentes interações patógeno x hospedeiro (Heath, 1981).

O loci *Rph* confere resistência qualitativa à ferrugem da folha da cevada. A resistência mediada por *Rph* é pós-haustorial e resulta em hipersensibilidade, enquanto a resistência parcial baseia-se no mecanismo pré-haustorial, sem RH e com formação de papila (Niks, 1986; Qi *et al.*, 1998; Hoogkamp *et al.*, 1998).

De maneira geral, a reação de hipersensibilidade desencadeada por resistência específica à raça é pós-haustorial (Anker & Niks, 2001). Em interações compatíveis os



eventos de morte celular são atrasados, permitindo a formação de micélio fúngico no interior do tecido foliar (Yao *et al.*, 1998). Desta forma, a suscetibilidade não implica necessariamente, na ausência de morte celular no sítio de infecção. Células necróticas podem ser encontradas no tecido colonizado em razão de estresse generalizado ou à senescência provocada pela presença do patógeno (Niks & Kuiper, 1983; Bender *et al.*, 2000).

Análises histopatológicas de plantas de trigo contendo os genes *Lr12* e *Lr13*, que conferem resistência de planta adulta à ferrugem da folha, evidenciaram que os mesmos conferem resistência pré-haustorial, via abortamento da penetração. Nesta, há redução na penetração de apressórios e abortamento de vesículas sub-estomatais (Bender *et al.*, 2000).

Ao estudar os mecanismos de resistência à ferrugem estriada do trigo (*P. striiformis* f. sp. *tritici*) em linhagens duplo-haplóides resultantes do cruzamento de uma cultivar com RPA x cultivar suscetível, Moldenhauer *et al.* (2008) verificaram a presença de 4 QTLs responsáveis pela RPA. Dependendo do QTL presente, as linhas variaram de resistentes até suscetíveis. Até o quinto dia após a inoculação, não houve diferenciação no crescimento do fungo, tanto em genótipos com resistência como em suscetíveis. A diferenciação entre as colônias ocorreu a partir do sexto dia. Um fato interessante é que a resposta variou de acordo com o QTL presente em cada linha, onde umas responderam exibindo lignificação, sem restringir o crescimento do fungo e, outras, não exibiram lignificação, porém restringiram o crescimento do patógeno. Houve diferença no acúmulo de transcritos (proteínas relacionadas à patogênese e marcadoras de RH, peroxidases e quitinases) entre os diferentes QTLs. Este é um exemplo de RPA com mecanismo de resistência pós-haustorial.

A resistência de não-hospedeiro também pode ser do tipo pós-haustorial. Algumas linhagens de trigo diplóides apresentam elevada resistência à ferrugem da folha da cevada, com formação frequente de haustórios e necrose celular (Niks & Dekens, 1991).

Outras respostas, diferentes da morte celular podem ocorrer em interações *Puccinia* x Poaceae com resistência do tipo pós-haustorial. São elas: deposição de material fibrilar na matriz extra-haustorial, redução na absorção de compostos da célula hospedeira via haustório, mudanças na membrana extra-haustorial, desenvolvimento de um colar de calose no colo do haustório e o encapsulamento do haustório através da síntese contínua de calose. Estes eventos podem ocorrer simultaneamente em uma única interação patógeno hospedeiro (Heath, 1981; Marte & Montalbini, 1999).

Ainda, pode-se citar a lignificação ao redor das colônias cerca de 5 dias após a inoculação, como verificado por Moldenhauer *et al.* (2008) na cultivar de cevada com resistência parcial à *P. hordei*, Kariega. A morte celular tardia, associada à produção de compostos fluorescentes (provavelmente compostos fenólicos) também é relatada na resistência parcial da cultivar de aveia URS 21 à *P. coronata* (Graichen, 2009).

Investigações histológicas da reação de *Medicago truncatula* à ferrugem da alfafa (*U. striatus*) indicaram que não há nenhuma manifestação macroscópica de necrose nesta resistência de não-hospedeiro, tampouco diferença na germinação e orientação dos tubos germinativos nas folhas das duas espécies. No entanto, houve falha significativa na proporção de unidades de infecção capazes de formar haustórios. A resistência ao fungo é do tipo pré-haustorial (Rubiales & Moral, 2004). Certa percentagem de falha na formação de apressórios sobre os estômatos é relatada tanto em interações de hospedeiro como de não-hospedeiro (Rubiales *et al.*, 1996).

A resistência de não-hospedeiro de cevada aos fungos *P. hordei-murini* e *P. triticina* é garantida pela combinação de mecanismos pré-haustoriais (sem RH) e pós-haustoriais (RH). Parece haver uma relação entre a duração do período de latência e o mecanismo de resistência, onde linhagens com longos períodos de latência apresentam resistência do tipo pré-haustorial, indicando que os genes para resistência parcial à *P. hordei* são efetivos contra espécies de ferrugens não patogênicas. No entanto, nem todas as linhagens apresentando resistência parcial apresentaram mecanismos pré-haustoriais de resistência. Ainda, genes que determinam a resistência pré-haustorial podem exibir especificidade às espécies de ferrugens, já que linhas com níveis similares de resistência pré-haustorial à *P. triticina*, diferiram, em alguns casos, nos níveis de resistência à *P. hordei-murini* (Hoogkamp *et al.*, 1998).

Uma vez que o fungo tenha penetrado no estômato e formado o primeiro haustório, serão retirados nutrientes da célula da planta para permitir o contínuo crescimento intercelular e a formação de mais haustórios. De modo geral, estudos comparando a resistência às ferrugens em hospedeiros e não-hospedeiros demonstraram que a resistência de não-hospedeiro é tipicamente pré-haustorial (Heath, 1981). Já a resistência mediada por genes *R* (de hospedeiro) é quase sempre pós haustorial, levando à morte a célula invadida. A resistência pré-haustorial também ocorre em interações patógeno x hospedeiro, geralmente através da resistência parcial (Niks & Rubiales, 2002; Rubiales & Moral, 2004).

Com base no exposto, sabe-se que sob condições de infecção a planta ativa respostas de defesa que incluem modificações bioquímicas e estruturais nas células atacadas. A resposta mais comum de resistência é a reação de hipersensibilidade (RH), que provoca a morte celular no sítio de infecção, a fim de restringir o desenvolvimento do patógeno (Dangl *et al.*, 1996; Hammond-Kosack & Jones, 1997; Yang *et al.*, 1997).

Alguns componentes da cascata de sinalização de defesa já foram identificados em dicotiledôneas, como *arabidopsis* e em monocotiledôneas, como o arroz e trigo (Zhang *et al.*, 2003; Kim & Zhang, 2004).

A resistência em plantas depende da habilidade de reconhecer o patógeno e desencadear os mecanismos de defesa que impeçam ou limitem a infecção. Embora a resistência genética seja amplamente utilizada no controle de ferrugens de cereais, pouco se sabe a respeito do mecanismo de ação dos genes envolvidos, principalmente no que diz respeito às resistências poligênica e não específica às raças e resistência de não-hospedeiros.

### **3.4 Ferrugem da folha do trigo**

A ferrugem da folha é uma das principais doenças do trigo (*Triticum aestivum* L.) e ocorre em praticamente todas as regiões do mundo onde o cereal é cultivado. É causada pelo fungo *Puccinia triticina* (= *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*). A doença se desenvolve rapidamente em temperaturas variando de 10 a 30°C. Os danos em rendimento dependem do estágio da planta em que a moléstia ocorre e, principalmente, da severidade, que é função da suscetibilidade da cultivar, da virulência da raça fisiológica e das condições ambientais (Roelfs *et al.*, 1992).

Na América do Sul, existem duas unidades epidemiológicas separadas pela Cordilheira dos Andes: a unidade Leste (que compreende a Argentina, o Brasil, o Paraguai, o Uruguai e as planícies da Bolívia) e a unidade Oeste (que compreende o Chile). Entre a Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai, quase 10 milhões de hectares de trigo têm sido plantados anualmente. Todos os anos ocorrem epidemias de ferrugem da folha nas regiões tritícolas dos países da unidade leste, pois há uma troca de esporos entre os diferentes locais. Estas epidemias frequentemente são severas e ocasionam

danos no rendimento de grãos de até 50%, se não for efetuado controle com fungicidas (Reis *et al.*, 1996; Annone & Nisi, 2003; Chaves & Barcellos, 2003; German, 2003; Viedma, 2003; Huerta-Espino *et al.*, 2011).

Os países do Cone Sul da América do Sul compartilham de algumas características que predispõem à ocorrência destas epidemias. As condições ambientais são extremamente favoráveis, áreas extensas são cultivadas com os mesmos genótipos, genótipos suscetíveis ou moderadamente suscetíveis ocupam grandes parte da área cultivada, as raças predominantes têm grande semelhança genética, há a presença de plantas de trigo voluntárias nas entressafras e as épocas de cultivo são subsequentes. Esses fatores contribuem para que o patógeno esteja presente na maior parte da região durante todos os meses do ano e favorecem o surgimento precoce da moléstia. Como resultado, durante todo o ano há uma grande quantidade de inóculo disponível, o que favorece a seleção e fixação de isolados mutantes com novas combinações de virulência (Barcellos & Chaves, 2003; Huerta-Espino *et al.*, 2011). No Brasil, os prejuízos ocasionados pela ferrugem da folha ocorrem anualmente, levando à necessidade de substituição de cultivares e de controle químico.

Os genes que conferem resistência à ferrugem da folha em trigo são denominados *Lr* (leaf rust). Já foram descritos mais de 50 genes *Lr* e alguns ainda possuem denominações temporárias (Zoldan & Barcellos, 2002). O uso de cultivares com resistência é considerado a forma mais eficiente e econômica para controle da ferrugem da folha do trigo, já que evita os danos causados pela moléstia sem aumentar os custos de produção. Vários genes de resistência já foram identificados e mapeados. Destaca-se a espécie afim diplóide *Triticum tauschii* Coss., doadora do genoma D do trigo cultivado, como uma importante fonte de genes de resistência à ferrugem. O centeio também é fonte de genes de interesse agrônomo, além dos genes de resistência

*Sr31*, *Lr26* e *Yr9*, para as três ferrugens do trigo (estriada, da folha e do colmo) (Autrique *et al.*, 1995, McIntosh *et al.*, 1995; Webster & Weber, 2007).

O agente causal da ferrugem da folha do trigo apresenta uma grande habilidade em superar genes de resistência específicos, diferenciando-se em uma a três novas raças/ano, com exceção de algumas safras. Porém, estes genes ainda são predominantes nos programas de melhoramento. Gradualmente, o fenômeno de perda de efetividade de genes de resistência está direcionando os cientistas para a busca e obtenção de cultivares com formas de resistência mais durável (Barcelos *et al.*, 1997; Kolmer & Liu, 2000; Singh *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2005; Huerta-Espino *et al.*, 2011).

De acordo com Johnson (1984), a resistência é considerada durável somente quando é efetiva por longos períodos de tempo, em grandes áreas e em condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença. Dentre os tipos de resistência considerados mais duráveis, destaca-se a resistência parcial, que permite o desenvolvimento restrito do patógeno pela redução da infecção, patogênese e esporulação quantitativamente. Este conceito é amplamente utilizado no melhoramento de trigo para resistência às ferrugens do colmo e da folha em programas de melhoramento no mundo (Parlevliet, 1975; Singh *et al.*, 2005).

Algumas cultivares mantêm a resistência por longos períodos. Estudos da herança desta resistência demonstram que estas cultivares geralmente possuem genes de resistência parcial, também descrita como resistência de planta adulta (RPA), com genes de efeito pequeno ou intermediário, porém aditivos. O acúmulo de quatro ou cinco genes deste tipo é capaz de conferir altos níveis de resistência, tanto à ferrugem da folha, como à ferrugem estriada do trigo (Singh *et al.*, 2005; Huerta-Espino *et al.*, 2011).

Plantas contendo estes genes apresentam tipo de infecção suscetível no estágio de plântula, já que os genes de RPA são expressos à medida que a planta se desenvolve. A combinação de genes de RPA condiciona formas de resistência mais duráveis, principalmente as que incluem os genes *Lr13* e *Lr34* (Dyck 1987; Roelfs, 1988). Pode haver grande variação nos níveis de RPA. Cultivares com resistência parcial podem apresentar pústulas de suscetibilidade e o efeito pode variar de acordo com alterações de temperatura e luz. O gene *Lr34* é mais efetivo em baixa temperatura e pouca luminosidade, enquanto *Lr13* em altas temperaturas. Um marcador morfológico para a presença do gene *Lr34* é a necrose na ponta da folha (Singh, 1992; Singh & Gupta, 1992).

Diversas cultivares com estes genes foram desenvolvidas na Argentina, Brasil e Uruguai. Frontana, uma cultivar brasileira, é considerada uma das melhores fontes de resistência durável à ferrugem da folha. Sua resistência tem servido como base para o melhoramento genético de cultivares na América do Norte e Austrália, as quais têm mantido resistência adequada (Barcellos *et al.*, 2000; Barcellos, 2002). A análise genética dessa cultivar e de outras variedades de trigo do Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT), possuidoras dos mesmos genes de Frontana, demonstrou que a RPA é baseada nos efeitos aditivos de *Lr34* e outros dois ou três genes, comumente conhecidos como complexo *Lr34* (Singh & Rajaram, 1992). São estes: *Lr13*, mais um modificador ou modificadores, *Lr34* e *LrT3*, além de outros genes (Dyck & Samborski, 1966; Dyck, 1987; Roelfs, 1988). Cultivares com estes genes demonstram uma resposta estável em diferentes ambientes, mesmo quando cultivadas em larga escala, com severidade final de ferrugem da folha em torno de 5%, mesmo sob condições de grande pressão patogênica (Singh, 1992).

O gene *Lr34* está ligado ao gene *Yr18*, que confere RPA à ferrugem estriada

(McIntosh, 1992). A resistência parcial conferida por *Lr34* baseia-se na redução da taxa de formação de haustórios nos primeiros estádios da infecção, acompanhada de pouca ou nenhuma necrose celular. Na cultivar Jupateco 73, contendo *Lr34*, verifica-se o acúmulo de substâncias eletro-densas em locais da célula próximos de onde as células mãe de haustórios tentam dissolver a parede celular das células do mesófilo para formação do haustório. O acúmulo destas substâncias causa endurecimento da parede celular, reduzindo o estabelecimento do “pescoço” haustorial. No caso de o haustório ser formado, o crescimento micelial será lento devido à restrição do movimento do fungo de uma célula para outra, justamente pelo endurecimento da parede celular das células da planta (Alvarez-Zamorano, 1995).

Toropi, outra cultivar brasileira lançada pela Secretaria de Agricultura do RS, em 1965 e cultivada extensivamente por 15 anos, é decendente de Frontana, porém, mais resistente que esta, indicando que existem diferenças genéticas entre as mesmas (Toropi não possui o gene *Lr34*) (Sousa, 2001; Rosa *et al.*, 2009). Esta resistência tem se mantido a mais de 45 anos. Genes de RPA como os de Toropi, expressam suscetibilidade mínima em condições de campo, mas não estão presentes em cultivares recentes. Barcellos (1994) identificou dois genes complementares e recessivos que conferem resistência estritamente em planta adulta em Toropi, designados *Trp-1* e *Trp-2*. De acordo com Rosa *et al.* (2009), Toropi possui pelo menos um gene de resistência raça-específico em fase de plântula e três de planta adulta.

A resistência de Toropi está localizada nos cromossomos 1AS e 4DS, localização não comum para outros genes de RPA em *T. aestivum* (Brammer, 2000; Silva, 2002). Acredita-se que a combinação da resistência de Toropi com *Lr34* (cromossomos 7 ou 5D) pode aumentar a durabilidade da resistência a ferrugem da folha do trigo (Barcellos, 1994; Barcellos *et al.*, 1997; Barcellos *et al.*, 2000). Além dos



genes de RPA de Toropi, o cromossomo 4D possui genes ligados à uma maior tolerância ao alumínio tóxico (Lagos *et al.*, 1991).

Alguns marcadores AFLP foram obtidos em Toropi, sendo que um deles já foi convertido em marcador SCAR. No entanto, seu uso na seleção assistida é limitado, pois este se encontra a 27 cM do gene. Isto se deve em parte à complexa organização genômica do trigo e pelo fato destes genes estarem localizados em regiões cromossômicas pobres em marcadores (Silva, 2006). Os marcadores *Trp1* e *Trp2* estão sendo validados e poderão ser utilizados no *screening* de cultivares resistentes. Linhagens homogêneas e bem adaptadas foram selecionadas e estão sendo testadas para um segundo ciclo de seleção para RPA à ferrugem da folha do trigo (German *et al.*, 2009).

Já foram identificados alguns genes com expressão diferencial na resistência de Toropi à ferrugem da folha. Dentre as sequências identificadas estão genes codificadores de proteínas de membranas potencialmente associados à percepção do patógeno e genes com domínios característicos de sinalizadores secundários para a resistência. Foram identificadas também, sequências homólogas a genes codificadores de enzimas chaves no controle de rotas de síntese de substâncias relacionadas à defesa (Silva, 2006).

A cultivar Trigo BR 35 também têm apresentado resistência considerada durável. Trigo BR 23 é outro exemplo de cultivar com RPA na qual a doença não causou prejuízos importantes, apesar do cultivo em área expressiva (Barcellos *et al.*, 2000).

Acredita-se que a RPA seja a alternativa mais promissora na busca de resistência durável, uma vez que não causa a intensa pressão de seleção sobre raças virulentas do patógeno, como ocorre com a resistência qualitativa, baseada em genes isolados. A RPA

se caracteriza pelo progresso lento da infecção, com resposta de suscetibilidade em fase de plântula. Embora haja infecção, o nível de suscetibilidade não provoca a morte de folhas, como em cultivares suscetíveis, em que as folhas secam enquanto as espigas ainda estão verdes. Na maioria dos anos, em cultivares com bons níveis de RPA a severidade da doença só aumenta quando os grãos já estão formados, dispensando o uso de fungicidas (Barcellos, 2002).

Moore (1953), citado por Welch (1995), afirmou que este tipo de resistência, quando incorporado a cultivares e utilizado por produtores, exerce menor pressão seletiva sobre o patógeno e possibilita a coexistência entre hospedeiro e doença. Moore argumentou que a possibilidade de uma nova raça se estabelecer é menor, pois não terá uma grande vantagem seletiva, uma vez que competirá com as demais raças presentes.

Neste contexto, a caracterização das reações de resistência nos patossistemas *Puccinia* x Poaceae, tanto em genótipos hospedeiros como em não-hospedeiros, é de extrema importância, pois auxiliará no melhor entendimento das interações planta-patógeno. As informações geradas neste trabalho fornecerão subsídios aos programas de melhoramento para o desenvolvimento de genótipos que combinem características agronômicas superiores e formas mais duráveis de resistência, além de expandir os conhecimentos a respeito da fisiologia da interação patógeno x hospedeiro.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos histológicos foram realizados na Faculdade de Agronomia da UFRGS e na EMBRAPA Trigo, Passo Fundo, RS. Os processos infeccioso e de colonização de *Puccinia triticina* foram avaliados em genótipos hospedeiros e não-hospedeiros, nas fases de plântula e planta adulta.

Em cada um dos grupos fez-se a quantificação das estruturas fúngicas formadas, verificando-se a ocorrência de respostas de defesa como: ocorrência de morte celular, formação de papilas na parede celular das células da planta, acúmulo de compostos autofluorescentes e a formação de peróxido de hidrogênio. Os métodos utilizados neste trabalho são descritos detalhadamente nos tópicos seguintes:

### 4.1 Material genético

A quantificação dos componentes histológicos foi realizada em plantas de trigo, cevada, aveia e arroz. Foram analisados os genótipos de trigo BRS 194, *Lr9* e Toropi, possuidores de diferentes reações de resistência à *P. triticina*. A cultivar BRS 194, desenvolvida pelo programa de Melhoramento Genético da EMBRAPA Trigo foi utilizada como testemunha suscetível e a linhagem isogênica *Lr9* como testemunha resistente, por possuir resistência qualitativa à raça de ferrugem utilizada neste trabalho. A cultivar Toropi foi selecionada por apresentar tipo de infecção suscetível, porém, baixa intensidade de doença no campo.

Para a quantificação dos processos infectivos em não-hospedeiros foram utilizadas a cultivar de cevada BRS 195 (EMBRAPA Trigo), por ter apresentado em testes preliminares (dados não apresentados) sinais visíveis da infecção por *P. triticina*, as cultivares de arroz Nippon Bare (variedade japônica que possui seu genoma sequenciado) e IRGA 417 (variedade índica desenvolvida pelo IRGA e umas das mais cultivadas no estado do RS), além da cultivar de aveia URS 22, desenvolvida pelo programa de Melhoramento Genético de Aveia da UFRGS.

#### **4.2 Semeadura e tratamentos culturais**

A semeadura para os testes com plântulas foi feita em copos plásticos contendo terra preta peneirada. Em cada copo foram semeadas dez sementes. Os genótipos foram dispostos em um delineamento experimental inteiramente ao acaso, com três repetições. Após a emergência as plântulas foram desbastadas de modo que restassem apenas cinco plântulas em cada copo. As plântulas foram mantidas em câmara climatizada à temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e com fotoperíodo de 16h durante todo o período de desenvolvimento do experimento.

Para os testes com planta adulta, foram semeadas dez sementes em potes plásticos com capacidade para 5L. Após a semeadura fez-se o desbaste, mantendo apenas cinco plantas por pote. No estágio de cinco folhas, fez-se a aplicação de uréia na dose recomendada (equivalente a 230 kg/ha) para o bom desenvolvimento nutricional das plantas. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento Menoncin<sup>®</sup> com temperatura de 18°C e umidade relativa do ar de 70%.

### 4.3 Inóculo e inoculação

A raça B56, correspondente à sigla MFP-CT pelo código internacional *Prt* (Long & Kolmer, 1989) de *P. triticina* foi utilizada na inoculação das plantas por induzir reações diferenciadas nos genótipos de trigo a serem utilizados. Para preparo do inóculo, fez-se uma suspensão de uredosporos em água destilada contendo Tween 20<sup>®</sup> (0,01%), na concentração de 10<sup>5</sup> a 10<sup>6</sup> esporos/ml.

Quando a primeira folha das plântulas estava totalmente expandida, dez dias após a semeadura, procedeu-se a inoculação na face adaxial das folhas. O arroz, por ter o desenvolvimento inicial atrasado em relação às outras culturas, foi inoculado quando estava com três folhas, cerca de três semanas após a semeadura. Desta forma, sempre se procedeu o plantio de arroz em período anterior aos outros cereais para que a época de inoculação coincidissem. Após a inoculação as plântulas foram incubadas em câmara úmida, no escuro, com umidade relativa próxima à saturação, por 18h.

Em plantas adultas procedeu-se a inoculação quando a folha bandeira estava totalmente expandida. Após a inoculação, as plantas foram incubadas através do mesmo procedimento utilizado em plântulas. Decorrido o período de incubação, foram mantidas em ambiente climatizado (câmara Menoncin<sup>®</sup>), com condições controladas de temperatura e umidade, até o aparecimento dos sintomas (12 a 15 dias após a inoculação), para garantir que a inoculação tenha sido efetiva, além de prover material para análise macroscópica.

### 4.4 Amostragem

Foram coletados segmentos da região mediana da folha com cerca de 1,5 cm de comprimento de cada um dos genótipos testados. Cada plântula foi considerada uma amostra. Em plantas adultas, fez-se a coleta de segmentos de folhas bandeiras oriundas

de plantas distintas. As amostras consistiram de três repetições. As coletas foram realizadas nos intervalos de tempo de 6, 12, 18, 36, 48, 72, 96, 120 e 240h após a inoculação (hai). Os horários de coleta variaram conforme cada ensaio, portanto, nem todos os ensaios contaram com todos os horários citados acima. Foi considerado como tempo 0h o momento em que as plantas foram colocadas no escuro.

#### **4.5 Quantificação dos componentes histológicos de resistência à ferrugem da folha do trigo em hospedeiros e não-hospedeiros**

##### **4.5.1 Coloração e exame microscópico**

##### **4.5.1.2 Eventos infectivos iniciais em genótipos hospedeiros**

Para avaliação dos eventos infectivos iniciais de *P. triticina*, referentes aos tempos 6, 12 e 18 hai, segmentos de folhas na fase de planta adulta dos genótipos Toropi e BRS 194, foram coletados e fixados através de um procedimento que dificulta a remoção dos esporos da superfície das folhas (Roderick & Thomas, 1997). De acordo com esta metodologia, segmentos de folha com cerca de 1,5 cm foram coletados e dispostos com a superfície adaxial (inoculada) voltada para cima, em placas de Petry contendo papel filtro embebido (4 mL) de etanol:ácido acético glacial (3:1). A solução e o papel filtro foram trocados diariamente até que as amostras estivessem totalmente descoloridas, cerca de 96h após a coleta, quando foram transferidas para placas contendo papel filtro embebido em água destilada e esterilizada (5 mL) pelo período de 2h, a fim de remover o excesso da solução descolorante e amaciar as folhas. Posteriormente, as amostras foram dispostas em placas contendo papel filtro embebido em lactoglicerol (5 mL) e foram armazenadas em geladeira.

Destes segmentos, foram separadas três amostras que foram coradas através de aspersão, com uma fina névoa do corante *Trypan blue* (0,1 %). As amostras foram

montadas em uma gota de lactoglicerol, cobertas com uma lamínula e seladas com esmalte.

A avaliação dos eventos infectivos iniciais foi realizada em microscópio Olympus BX41. Foram quantificadas as estruturas fúngicas formadas pelos esporos depositados sobre as folhas: esporos germinados, apressórios desenvolvidos sobre os estômatos (ASEs), apressórios desenvolvidos nas células da epiderme (ACEs), vesículas sub-estomatais (VSEs), hifas infectivas (HFs), células-mãe-de haustórios (CMHs) e haustórios (Hs) nos aumentos de 200 e 400x. As estruturas foram fotografadas com uma câmera Sony P200, diretamente na ocular do microscópio.

Este método foi utilizado apenas nos horários iniciais, pois não permitiu uma boa visualização das estruturas fúngicas no interior dos tecidos em horários mais avançados da infecção. Para avaliação dos eventos infectivos intermediários e finais, houve uma re-adequação da metodologia, permitindo uma melhor clarificação dos tecidos e conseqüentemente, melhor visualização das estruturas infectivas de *P. triticina*.

#### **4.5.1.3 Eventos infectivos intermediários e finais**

Foram considerados eventos intermediários os presentes em 48 hai e finais os presentes em 120 hai e 240 hai.

##### **4.5.1.3.1 Avaliações na fase de plântula**

Para avaliação dos eventos infectivos intermediários e finais de *P. triticina*, foram coletados segmentos foliares de plântulas dos genótipos BRS 194, BRS 195, URS 22, IRGA 417 e Nippon Bare em 48, 120 e 240 hai. Os segmentos de folhas foram clareados e fixados por 24h em uma solução de etanol:clorofórmio (3:1 v/v) e ácido

tricloro-acético (0,15%). Decorridas as 24h, os segmentos foram armazenados em uma solução de glicerol 50% para posterior coloração. A coloração foi feita por aquecimento (90 a 100°C) em solução de *Trypan blue* 0,03% em lactofenol:etanol (1:2 v/v) durante 5 min. Após, as amostras foram imersas em solução saturada de cloral hidratado (5:2 p/v) por pelo menos 48h, para clareamento (retirada do excesso de corante dos cloroplastos). As amostras coloridas com *Trypan blue* foram submetidas à série de etanol 80% (30 min), 90% (30 min) e 100% (2 vezes de 30 min) para a desidratação e coradas com uma solução saturada de ácido pícrico (2%) em metil salicilato durante 5 min. Posteriormente, as amostras foram imersas em metil salicilato por 15 min (MacBryde, 1936). Os segmentos foliares corados foram montados com a superfície adaxial voltada para cima em metil salicilato, cobertos com uma lamínula e selados com uma camada de esmalte.

Nestas avaliações, foram quantificadas as estruturas fúngicas formadas pelos esporos depositados sobre as folhas: esporos germinados, apressórios desenvolvidos sobre os estômatos (ASEs), vesículas sub-estomatais (VSEs), hifas infectivas (HFs), células-mãe-de haustórios (CMHs) e haustórios (Hs). Além disto, verificou-se a presença de colônias formadas (caracterizadas pelo crescimento de hifas intercelulares e formação de haustórios) e de tecido esporogênico (precursor dos esporos), nos aumentos de 200 e 400x. Quando necessário, utilizou-se o aumento de 1000x. As estruturas foram fotografadas com uma câmera Sony P200, diretamente na ocular do microscópio.

#### **4.5.1.3.2 Avaliações na fase de planta adulta**

As avaliações em planta adulta seguiram exatamente a mesma metodologia descrita para as análises em plântulas (ítem 4.5.1.3.1). A diferença consiste nos



genótipos utilizados, já que neste caso introduziram-se os genótipos de trigo Toropi e *Lr9*. Toropi não foi testada na fase de plântula, pois sua resistência somente se manifesta na fase de planta adulta. A cultivar de aveia URS 22 não foi testada na fase de planta adulta, pois os ensaios onde ela estava inserida foram perdidos devido a falhas na câmara Menoncin<sup>®</sup>.

#### 4.5.2 Análise dos dados

As estruturas formadas pelo fungo nos diferentes genótipos foram quantificadas e suas proporções foram calculadas em cada um dos horários de coleta da seguinte forma:

- Proporção de esporos germinados: (número de esporos germinados/número de esporos observados) x 100;
- Proporção de apressórios formados sobre estômatos (ASEs): (número de ASEs/número de esporos germinados) x 100;
- Proporção de vesículas sub-estomatais (VSEs) formadas: (número de VSEs/número de ASEs) x 100;
- Proporção de células-mãe-de-haustórios (CMHs): (número de CMHs/número de VSEs) x 100;
- Proporção de haustórios (Hs): (número de Hs/número de CMHs) x 100;
- Proporção de colônias estabelecidas: (número de colônias/número Hs) x 100
- Proporção de colônias associadas à formação de tecido esporogênico (número de colônias com tecido esporogênico/número de colônias estabelecidas) x 100.

Com o cálculo destas variáveis foram construídos gráficos para ilustrar o desenvolvimento das estruturas do fungo e da evolução do processo infeccioso de maneira sequencial. Nestes gráficos o tempo (horas após a inoculação) foi considerado como abscissa e a proporção das estruturas fúngicas formadas em cada genótipo como variável dependente.

Em 240 h foram feitas análises qualitativas e não quantitativas devido à intensa colonização dos tecidos, o que dificultou a contagem de estruturas fúngicas.

Os dados de proporções de esporos germinados, ASEs, VSEs, CMHs, HFs, Hs, formação de colônias e tecido esporogênico foram analisados pelo teste de  $\chi^2$  e submetidos à análise de variância em nível de 5% de significância. As pressuposições teóricas da análise de variância foram testadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis que não apresentaram distribuição normal ( $P < 0,05$ ) foram transformadas pelo arcoseno da raiz quadrada ou coseno da raiz quadrada. O modelo utilizado incluiu o fator genótipo como efeito fixo e a repetição como efeito aleatório, dentro de cada hora após a inoculação. Quando detectadas diferenças entre os genótipos, efetuou-se a comparação de médias pelo teste Tukey em nível de 5% de significância. As variáveis foram estudadas por meio do programa estatístico SAS v. 8.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

#### **4.6 Avaliações histológicas e histoquímicas das reações de resistência à ferrugem da folha do trigo em hospedeiros e não-hospedeiros**

##### **4.6.1 Histopatologia e respostas de defesa**

A quantificação das estruturas fúngicas permitiu a determinação do grau de desenvolvimento fúngico em cada genótipo e a identificação de respostas de resistência, quando presentes. Nas amostras preparadas para as análises histológicas em 48 e 120h

após a inoculação, também foram avaliadas:

- a) Ocorrência de morte celular nas células do hospedeiro associadas às tentativas de colonização: foram quantificados os locais de infecção por *P. triticina* associados com células intensamente coradas com *Trypan blue*, já que este corante possui afinidade por tecidos vegetais mortos (van Wees, 2008). A proporção de tentativas de colonização associadas à morte celular foi calculada pela divisão do número de tentativas de colonização com morte celular pelo número total de tentativas avaliadas;
- b) Formação de papilas na parede celular do hospedeiro: a ocorrência de papilas foi verificada em microscopia de contraste de fases e caracterizada pelo acúmulo de aposições intensamente brilhantes na parede celular do hospedeiro, quando em contato com hifas do fungo (Niks, 1986; Bender *et al.*, 2000). A proporção de formação de papilas foi obtida da mesma forma a qual se avaliou a ocorrência de morte celular.

#### **4.6.2 Histolocalização de compostos autofluorescentes**

Para a análise da presença de compostos autofluorescentes associados às tentativas de colonização e ou colônias, foram testados na fase de plântula os genótipos BRS 194, BRS 195, URS 22, IRGA 417 e Nippon Bare, nos horários 48 e 120 hai. Na fase de planta adulta foram testados os genótipos BRS 194, Toropi e *Lr9* em 36 hai e BRS 194, Toropi, *Lr9*, BRS 195, IRGA 417 e Nippon Bare, em 48 e 120 hai. Nestas análises as amostras foram fixadas e clareadas conforme metodologia descrita no ítem 4.5.1.3.1, mantidas em cloral hidratado por pelo menos 48h para clarificar ainda mais os tecidos e montadas em glicerol 50%. As avaliações foram feitas em microscópio Olympus BX 41, sob luz azul epifluorescente (com auxílio de filtros de excitação U-

MWB2 GPF: 450-480 nm e filtros de barreira BA515: 500 nm). Foram avaliadas 50 unidades de infecção que consistiram de pelo menos um esporo + ASE quanto a presença ou ausência de células do hospedeiro com autofluorescência. A proporção de unidades de infecção associadas à produção de compostos autofluorescentes foi calculada das seguintes formas:

- Proporção de unidades de infecção associadas à produção de compostos autofluorescentes/número de unidades infectivas (esporo + ASE) x 100;
- Proporção de unidades de infecção associadas à produção de compostos autofluorescentes/número de unidades infectivas penetrantes (com formação de VSEs) x 100.

#### **4.6.3 Histolocalização de espécies reativas de oxigênio (ROS)**

Para visualização da produção de espécies reativas de oxigênio, três amostras de cada genótipo, em fase de plântula e planta adulta, foram coletadas em 24, 48, 72, 96 e 120 hai e imersas em uma solução de DAB 0,1% (3,3'-diaminobenzidina-4 HCl) em água acidificada (pH 3,8). Imediatamente após a imersão na solução de DAB, as amostras foram infiltradas à vácuo por cerca de 5 min. Decorrido este tempo, as amostras foram mantidas sob luz durante 30 min e transferidas para o escuro por 5h. Posteriormente, fez-se a fixação e clareamento das amostras como citado no ítem 4.5.1.3.1. As amostras foram montadas em glicerol 50% e avaliadas sob microscopia de luz, no microscópio Olympus BX 41.

Em cada amostra foram quantificados o número de esporos germinados, de ASEs e de VSEs. De acordo com Jagger *et al.* (2011), consideram-se como tentativas de penetração os locais onde se formaram ASEs e penetrações de sucesso os locais onde se formaram VSEs. As proporções dos eventos de germinação e penetração foram

calculadas da mesma forma citada no ítem 4.5.2. A proporção de tentativas de penetração associadas à produção de ROS foi calculada pela divisão do número destas pelo total de tentativas x 100.

#### **4.6.4 Análise dos dados**

Os dados de proporções de colônias com morte celular, formação de papila e presença de células autofluorescentes foram analisados pelo teste de  $\chi^2$ . A discriminação entre proporções foi realizada pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade, utilizando o Programa SAS, versão 8.0. (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

A investigação da ocorrência de associação entre as variáveis foi calculada através do coeficiente de correlação de Pearson ( $\rho$ ), onde foram analisadas: a formação de colônias e tecido esporogênico, a proporção de tentativas de penetração associadas à morte celular, produção de compostos autofluorescentes, de espécies reativas de oxigênio e de papilas, 48 e 120 hai. Foram considerados significativos os coeficientes que apresentaram no teste  $t$ , nível de 5%;  $P \leq 0,05$ .

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do Programa SAS, versão 8.0. (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

#### **4.6.5 Análises histopatológicas em microscopia espectral confocal**

As análises em microscopia confocal foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS, localizado no Campus do Vale. Para tal, amostras dos genótipos BRS 194, BRS 195, URS 22, Irga 417 e Nippon Bare, na fase de plântula, coletadas 120 hai, foram fixadas e clareadas conforme descrito no ítem 4.5.1.3.1 e armazenadas em glicerol 50%. Posteriormente, passaram por uma lavagem em etanol 50% durante 15 min (2 x), foram incubadas em NaOH 0,5 M por 30 min e enxaguadas em água

destilada por três vezes. Após, as amostras foram incubadas em solução tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 5,8) durante 30 min, a partir de onde se fez a coloração com Uvitex 2B 0,1% (w:v) no mesmo tampão, por 5 min. As amostras foram então lavadas quatro vezes em água destilada (10 min por lavagem) e montadas em glicerol 50%. A observação foi feita em microscópio confocal Olympus FluoView 1000 (com excitação pela combinação de lasers de comprimento de onda entre 405 e 473 nm). A fluorescência emitida pelas amostras foi restringida aos comprimentos de onda de 460 – 470 nm e 510 – 530 nm, a fim de capturar a máxima fluorescência emitida pelo corante e de alguns compostos de defesa produzidos pelas plantas, respectivamente. Este tipo de microscopia permite a obtenção de imagens tridimensionais das colônias e estruturas fúngicas.

#### **4.7 Exame macroscópico**

O tipo de infecção produzido foi avaliado 15 dias após a inoculação. Foram avaliadas as reações macroscópicas, através da visualização dos sintomas e sinais, conforme escala específica (Tabela 1), onde foram considerados resistentes os genótipos com reação 0, 1 e 2 (e suas variações para mais ou menos) e suscetíveis aqueles com tipo de infecção 3 e 4 (e suas variações para mais ou menos) (Roelfs *et al.*, 1992).

Para classificar o tipo de resistência de não-hospedeiro, levou-se em conta os critérios descritos por Heath (2000) e Oh *et al.* (2006), onde:

- Resistência do tipo 1 – sem produção de sintomas ou sinais visíveis;
- Resistência do tipo 2 – associada com RH rápida e localizada e algum sinal visível da infecção pelo patógeno.

TABELA 1. Reação, tipo de infecção e sintomas de *Puccinia triticina* sobre a primeira folha de trigo (Roelfs *et al.*, 1992). Porto Alegre, RS. 2011.

Reação	Tipo de infecção	Sintomas
<b>R</b>	0	Nenhuma pústula ou outro sinal macroscópico de infecção
	;	Sem pústulas, com pequenos pontos cloróticos ou necróticos (hipersensibilidade)
	1	Pústulas diminutas, circundadas por clorose/ necrose
	2	Pústulas pequenas a médias, freqüentemente circundadas por clorose ou necrose
<b>S</b>	3	Pústulas médias, que podem estar associadas com clorose
	4	Pústulas grandes, sem clorose

R= Resistência; S=suscetibilidade

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Quantificação dos componentes histológicos de resistência à ferrugem da folha do trigo em hospedeiros e não-hospedeiros**

#### **5.1.1 Coloração e exame microscópico**

##### **5.1.1.2 Eventos infectivos iniciais em genótipos hospedeiros**

A fim de verificar diferenças nos eventos infectivos iniciais entre os genótipos de trigo Toropi, possuidor de resistência parcial e BRS 194, suscetível à *P. triticina*, na fase de planta adulta, foram feitas coletas de folhas bandeiras em 6, 12 e 18 horas após a inoculação (hai).

Às 6 hai grande parte dos esporos de *P. triticina* já havia formado tubos germinativos. A orientação do crescimento dos tubos germinativos foi preferencialmente no sentido perpendicular às nervuras das folhas (Figura 3). No entanto, muitos tubos germinativos cresceram em sentido aleatório. Embora o comprimento dos tubos germinativos não tenha sido uma variável avaliada neste trabalho, percebeu-se que estes podem variar de curtos a muito longos.

A taxa de germinação de esporos depositados sobre as folhas, na fase de planta adulta, foi similar entre os genótipos Toropi e BRS 194. Houve diferença na taxa de germinação de esporos apenas entre os horários testados ( $P=0,0222$ ). A germinação foi superior a 60% em todos os horários (6, 12 e 18 hai), com maior expressividade e uniformidade em 18 hai. A partir de 12 hai verificou-se uma maior homogeneidade de



germinação, próxima a 80% em ambos os genótipos (Figura 4). A proporção de esporos germinados não possibilitou diferenciar o genótipo com resistência parcial do genótipo suscetível.

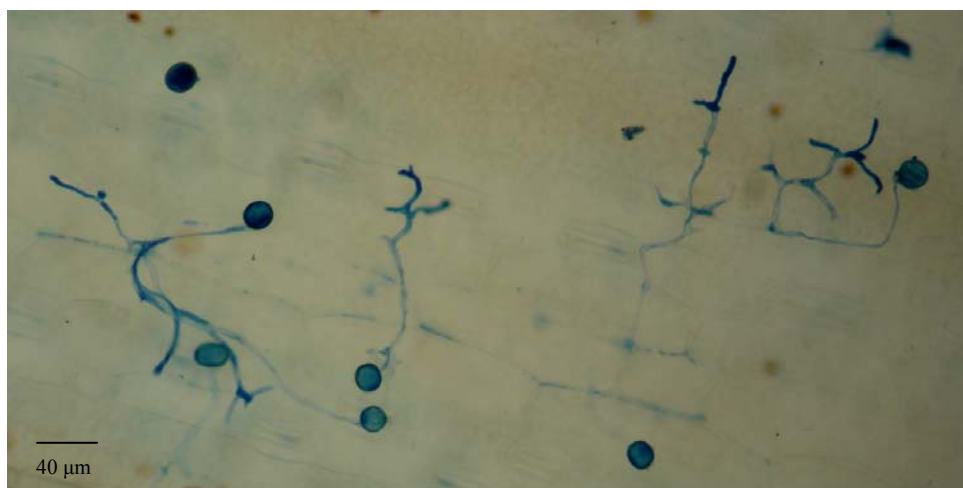


FIGURA 3. Esporos de *Puccinia triticina* germinados na superfície de folha da cultivar de trigo BRS 194, com orientação do crescimento no sentido perpendicular à nervura das folhas. A= 200x. Porto Alegre, RS. 2011.

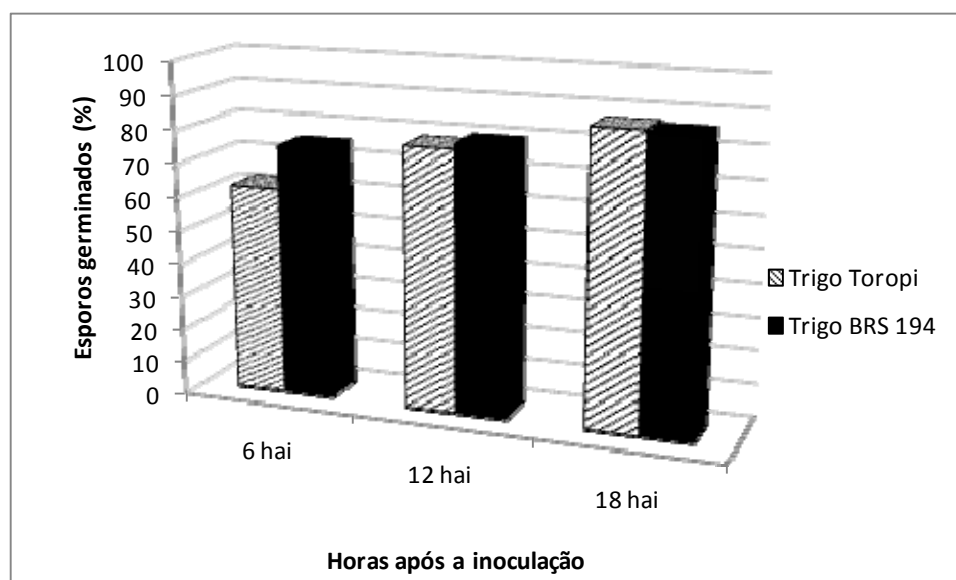


FIGURA 4. Proporção de esporos de *Puccinia triticina* germinados sobre folhas de genótipos de trigo resistente e suscetível, 6, 12 e 18 horas após a inoculação, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.

A formação de apressórios iniciou-se 6 hai (Figura 5). Ambos os genótipos apresentaram um aumento gradativo na taxa de formação de apressórios sobre estômatos (ASEs) no decorrer do tempo. A menor proporção de formação de ASE foi de 5,4%, em Toropi, 6 hai.

Às 18 hai houve a maior diferenciação de ASEs ( $P=0,0046$ ). Em BRS 194 esta taxa foi de cerca de 30% e em Toropi de 17%. Porém, esta diferenciação não foi suficiente para separar os genótipos em duas classes distintas (Figura 6).

Além da formação de ASEs, houve uma alta taxa de formação de apressórios nas células da epiderme de ambos os genótipos (Figura 7). Esta taxa variou de 10 – 40% dos apressórios formados, no entanto, estes apressórios não foram inseridos na contagem para realização dos cálculos de proporções apresentados, visto que o fungo só penetra na planta quando forma apressórios sobre os estômatos.

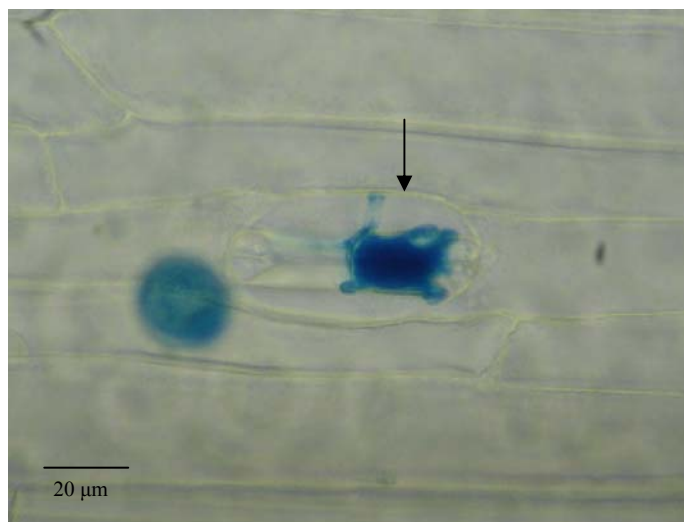


FIGURA 5. Desenvolvimento de apressório de *Puccinia triticina* na cultivar de trigo BRS 194, na fase de planta adulta, 6 hai. A= 400x. Porto Alegre, RS. 2011.

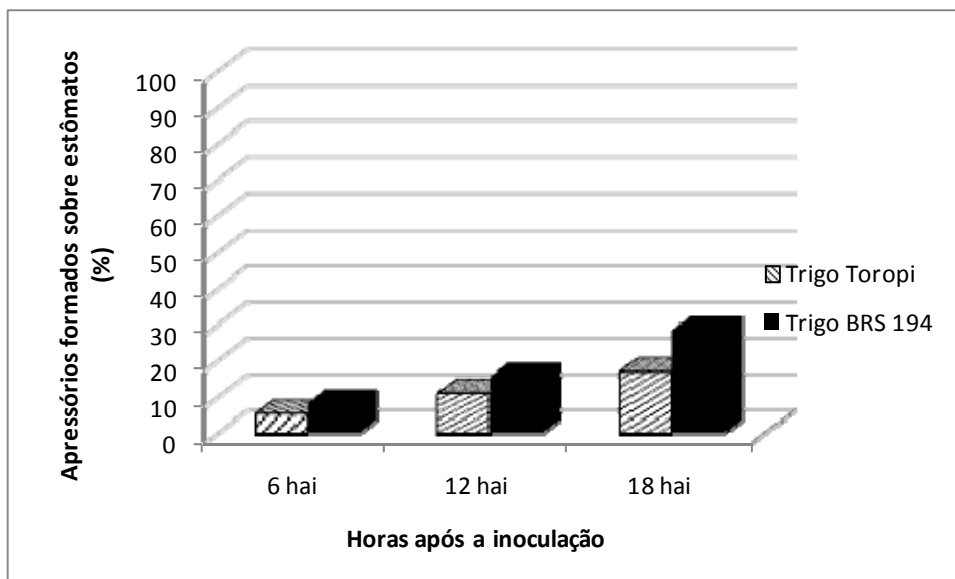


FIGURA 6. Proporção de apressórios de *Puccinia triticina* formados sobre estômatos de genótipos de trigo resistente e suscetível, 6, 12 e 18 horas após a inoculação, em relação ao número de esporos germinados, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.

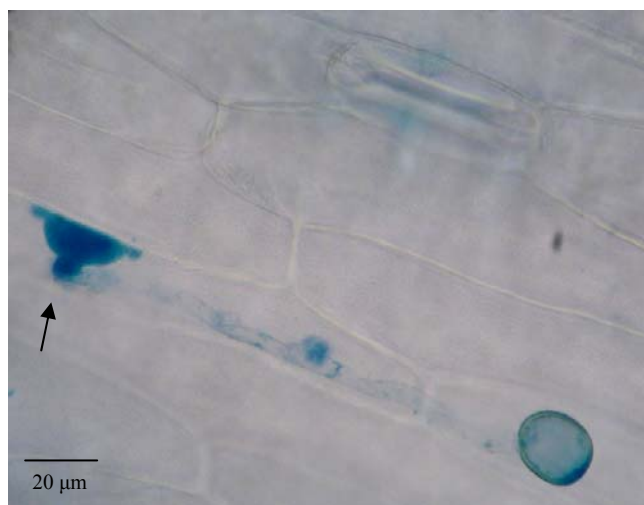


FIGURA 7. Desenvolvimento de apressório de *Puccinia triticina* em célula da epiderme da cultivar de trigo BRS 194, na fase de planta adulta, 6 hai. A=400x. Porto Alegre, RS. 2011.

As vesículas sub-estomatais (VSEs) foram visualizadas a partir de 12 hai. Neste momento, foram verificadas as primeiras diferenças significativas entre os genótipos ( $P=0,0039$ ). Em BRS 194, 12 hai, 46% dos ASEs diferenciaram VSEs enquanto que em Toropi a taxa de formação de VSEs foi de 11%. Às 18 hai, BRS 194 apresentou uma

taxa de formação de ASEs de 52% enquanto que em Toropi este valor foi próximo da metade (24%) (Figura 8).

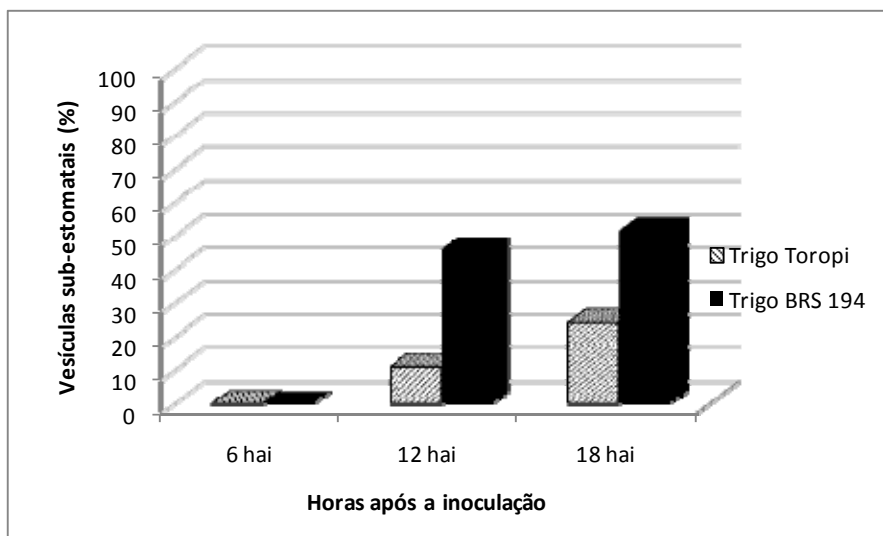


FIGURA 8. Proporção de vesículas sub-estomatais de *Puccinia triticina* formadas em genótipos de trigo resistente e suscetível, 6, 12 e 18 horas após a inoculação, em relação ao número de apressórios formados sobre estômatos, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.

As hifas infectivas (HFs) foram diferenciadas somente 18 hai (Figura 9). Em Toropi houve uma menor diferenciação de HFs (20%) que em BRS 194, onde 66% das VSEs diferenciaram HFs ( $P=0,0001$ ) (Figura 10).



FIGURA 9. Desenvolvimento de vesícula sub-estomatal (VSE) e hifa infectiva (HF) de *Puccinia triticina* na cultivar de trigo Toropi, na fase de planta adulta, 18 hai. A= 400x. Porto Alegre, RS. 2011.

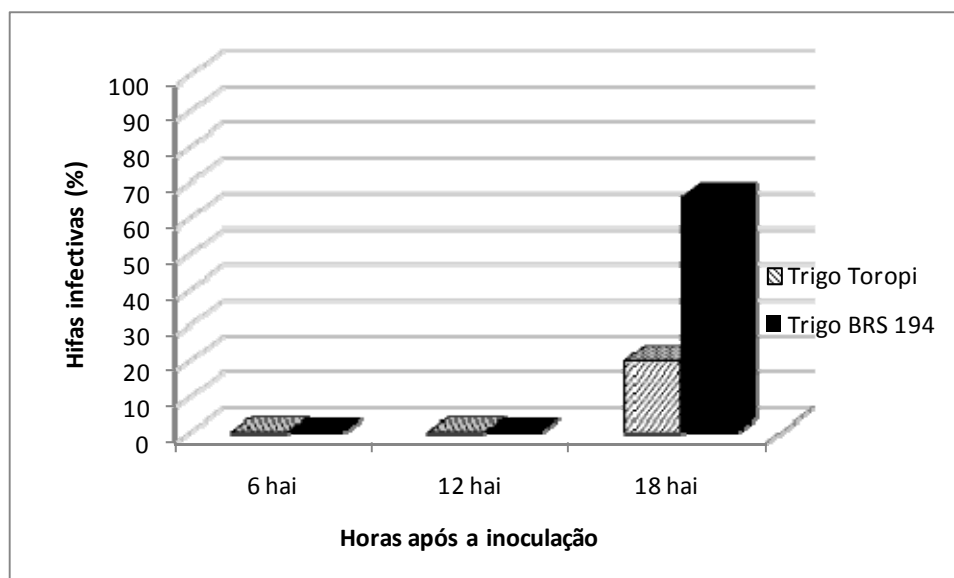


FIGURA 10. Proporção de hifas infectivas de *Puccinia triticina* formadas em genótipos de trigo resistente e suscetível, 6, 12 e 18 horas após a inoculação, em relação ao número de vesículas sub-estomatais formadas, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.

Às 18 hai, 32% das HFs diferenciaram células-mãe-de-haustórios (CMHs) em BRS 194 (Figuras 11 e 12). Em Toropi não foram observadas CMHs neste mesmo tempo.

De acordo com os resultados obtidos neste primeiro experimento que avaliou os horários iniciais de infecção por *P. triticina*, acredita-se que a resistência de Toropi à ferrugem da folha do trigo ocorra já no início do processo de interação planta-patógeno, sendo expressa mais efetivamente a partir formação de VSEs produzidas pelo fungo. Desta forma, a diferenciação de todos os eventos infectivos que ocorrem posteriormente à formação desta estrutura são reduzidos de forma sequencial.

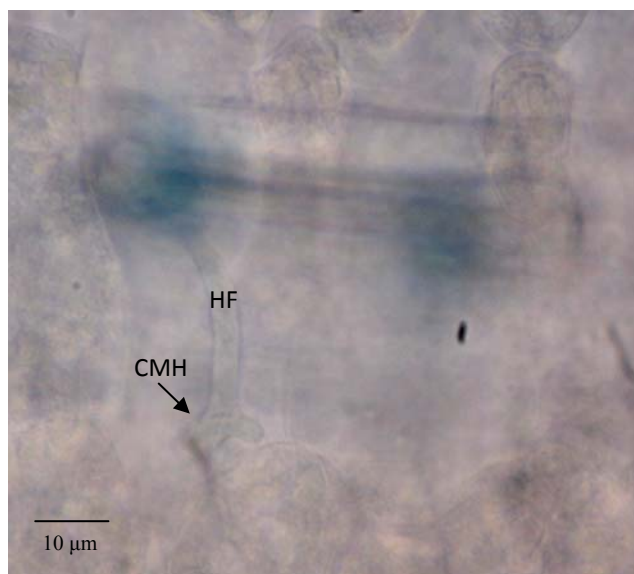


FIGURA 11. Desenvolvimento de hifa infectiva (HF) e de célula-mãe-de-haustório (CMH) de *Puccinia triticina* na cultivar de trigo BRS 194, na fase de planta adulta, 18 hai. A= 400x. Seta indica a CMH. Porto Alegre, RS. 2011.

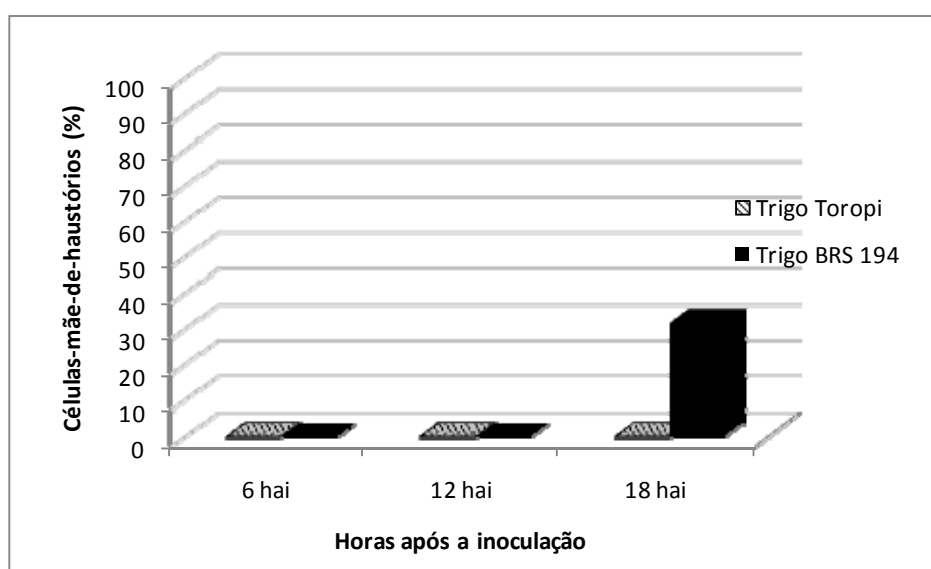


FIGURA 12. Proporção de células-mãe-de-haustórios de *Puccinia triticina* formadas em genótipos de trigo resistente e suscetível, 6, 12 e 18 horas após a inoculação, em relação ao número de hifas infectivas formadas, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.

### 5.1.1.3 Eventos infectivos intermediários e finais

### 5.1.2 Avaliações na fase de plântula

As análises, na fase de plântula, dos eventos infectivos intermediários e finais

envolvidos na infecção por *P. triticina* visaram identificar possíveis diferenças na resposta de resistência de espécies de Poaceae não-hospedeiras da ferrugem da folha do trigo. Para tal, foram quantificadas as estruturas fúngicas formadas e as respostas de resistência dos genótipos de trigo (BRS 194), de aveia (URS 22), cevada (BRS 195) e arroz (Irga 417 e Nippon Bare), em 48, 120 e 240 hai.

Em 48 hai a proporção de esporos germinados diferiu entre os genótipos testados ( $P=0,0309$ ). O genótipo de aveia, URS 22, apresentou a maior proporção de esporos germinados (92%), seguido de BRS 195 (cevada) e BRS 194 (trigo). Os genótipos de arroz (Irga 417 e Nippon Bare) foram os que apresentaram as menores proporções de germinação, 77 e 66%, respectivamente. Em 120 hai esta proporção foi similar entre os genótipos, variando de 85% (em URS 22 e BRS 195) até 65%, em Nippon Bare ( $P=0,2132$ ) (Figura 13). Em média, a proporção de esporos germinados foi similar nos genótipos de trigo, aveia e cevada e apresentou-se reduzida nos genótipos de arroz (Tabela 2).

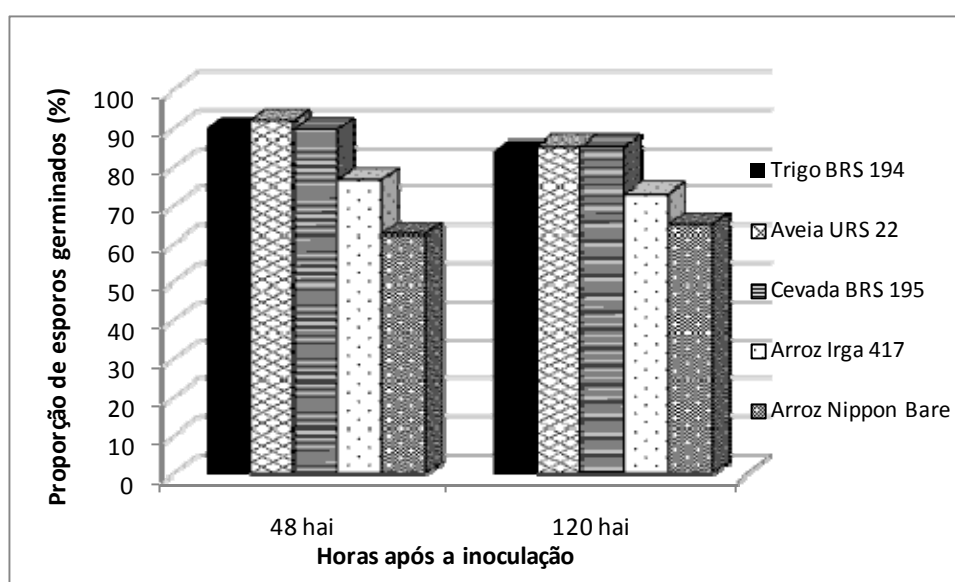


FIGURA 13. Proporção de esporos de *Puccinia triticina* germinados sobre folhas de diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 horas após a inoculação, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.

TABELA 2. Germinação de esporos de *Puccinia triticina* sobre folhas de diferentes espécies de Poaceae, na fase de plântula, em 48 e 120 hai. Porto Alegre, RS. 2011.

Horário	Genótipo				
	BRS 194 (trigo)	URS 22 (aveia)	BRS 195 (cevada)	Irga 417 (arroz)	Nippon Bare (arroz)
48 hai	90 ab*	92,1 a	89,79 ab	76,56 ab	62,5 b
120 hai	84,15 a	85,45 a	85,43 a	73,07 a	65 a
Médias	87,075	88,775	87,61	74,815	63,75

CV= 11,19%

\*Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%.

Tanto em 48 como em 120 hai, houve diferença significativa na proporção de apressórios formados sobre estômatos ( $P= 0,0159$  e  $0,0002$ , respectivamente). Em 48 hai, BRS 194 e BRS 195 apresentaram proporções bem similares de ASEs (51%), enquanto que em URS 22 esta proporção foi próxima da metade (27%). Os genótipos Irga 417 e Nippon Bare apresentaram as menores taxas de formação de ASE (12%). Em 120 hai, as maiores proporções de formação de ASEs também foram observadas em BRS 194 (66%) e BRS 195 (57%), seguidas por URS 22 (45%), Irga 417 (16%) e Nippon Bare (4%) (Figura 14). Em média, a taxa de formação de ASEs foi similar entre trigo e cevada, intermediária em aveia e reduzida em arroz (Tabela 3).

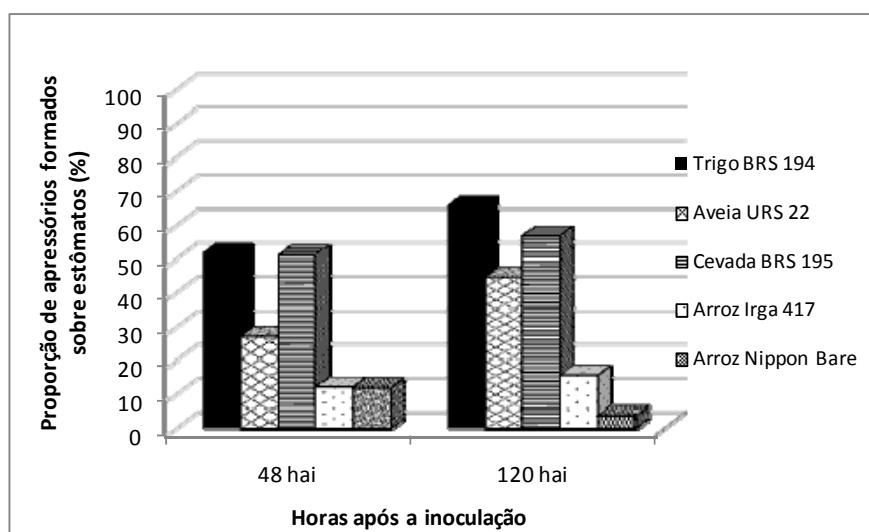


FIGURA 14. Proporção de apressórios de *Puccinia triticina* formados sobre estômatos de diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 horas após a



inoculação, em relação ao número de esporos germinados, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.

TABELA 3. Diferenciação de apressórios de *Puccinia triticina* sobre estômatos de diferentes espécies de Poaceae, na fase de plântula, em 48 e 120 hai. Porto Alegre, RS. 2011.

Horário	Genótipo				
	BRS 194 (trigo)	URS 22 (aveia)	BRS 195 (cevada)	Irga 417 (arroz)	Nippon Bare (arroz)
48 hai	51,85 a*	27,14 ab	51,13 a	12,24 ab	12 b
120 hai	65,88 a	44,68 ab	56,81 a	15,78 bc	3,84 c
Médias	58,865	35,91	53,97	14,01	7,92
CV= 22,81%					

\*Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%.

Em 48 hai, a proporção de VSEs formadas não diferiu significativamente entre os genótipos, variando de 33 a 76% ( $P=0,5139$ ). Em 120 hai, a proporção de VSEs foi similar entre BRS 194 e URS 22, intermediária em BRS 195 e reduzida em Irga 417 e Nippon Bare ( $P=0,0187$ ) (Figura 15 e Tabela 4).

Considerando-se a média de formação de VSEs em cada genótipo, percebe-se que a maior proporção ocorreu em BRS 194 (83%), seguido de URS 22 (70%) e BRS 195 (58%). As menores proporções foram visualizadas em Irga 417 e Nippon Bare, com 42 e 17%, respectivamente.

Houve um amarelecimento bem característico abaixo dos ASEs formados nos genótipos de arroz Irga 417 e Nippon Bare, em 120 e 240 hai. O desenvolvimento de estruturas infectivas de *P. triticina* foi limitado nestes genótipos, sendo paralisado após a formação de VSEs, geralmente bem pequenas (Figuras 16 e 17). Nos genótipos BRS 195 (cevada) e URS 22 (aveia) as VSEs formadas e que não deram origem a outras estruturas fúngicas geralmente apresentaram tamanho menor do que as VSEs observadas em BRS 194, nos mesmos horários. Muitas destas VSEs apresentaram um aspecto de deterioração.

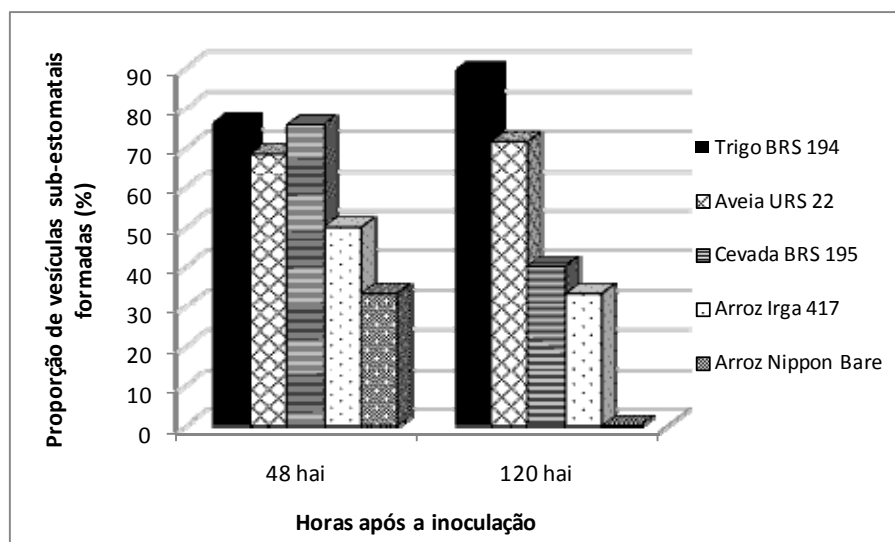


FIGURA 15. Proporção de vesículas sub-estomatais de *Puccinia triticina* formadas em diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 horas após a inoculação, em relação ao número de apressórios formados sobre estômatos, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.

TABELA 4. Diferenciação de vesículas sub-estomatais de *Puccinia triticina* em diferentes espécies de Poaceae, na fase de plântula, em 48 e 120 hai. Porto Alegre, RS. 2011.

Horário	Genótipo				
	BRS 194 (trigo)	URS 22 (aveia)	BRS 195 (cevada)	Irga 417 (arroz)	Nippon Bare (arroz)
48 hai	76,19 a*	68,42 a	75,55 a	50 a	33,33 a
120 hai	89,28 ab	71,42 ab	40 bc	33,33 c	0 d
Médias	82,73	69,92	57,77	41,66	16,66

CV= 17,11%

\*Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%.

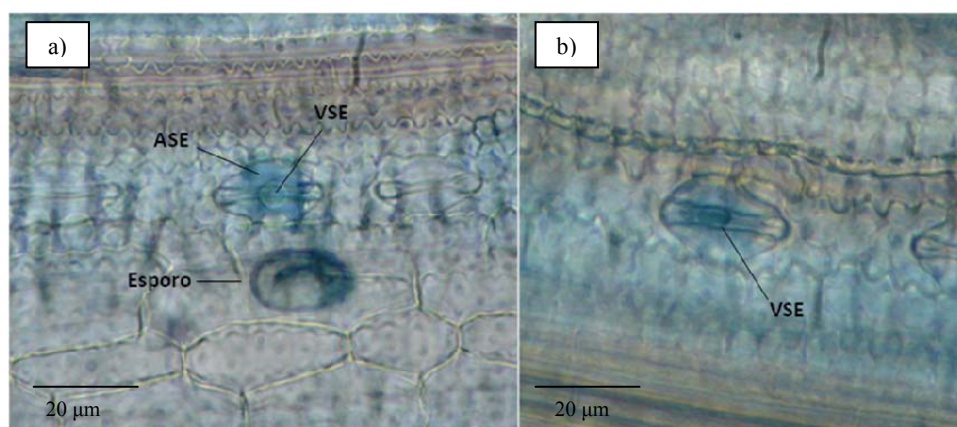


FIGURA 16. Formação de vesícula sub-estomatal de *Puccinia triticina* em folhas de arroz, 48 hai, em fase de plântula. a) Irga 417 e b) Nippon Bare. A= 400x. Apressório sobre estômato= ASE; vesícula sub-estomatal= VSE. Porto Alegre, RS. 2011.

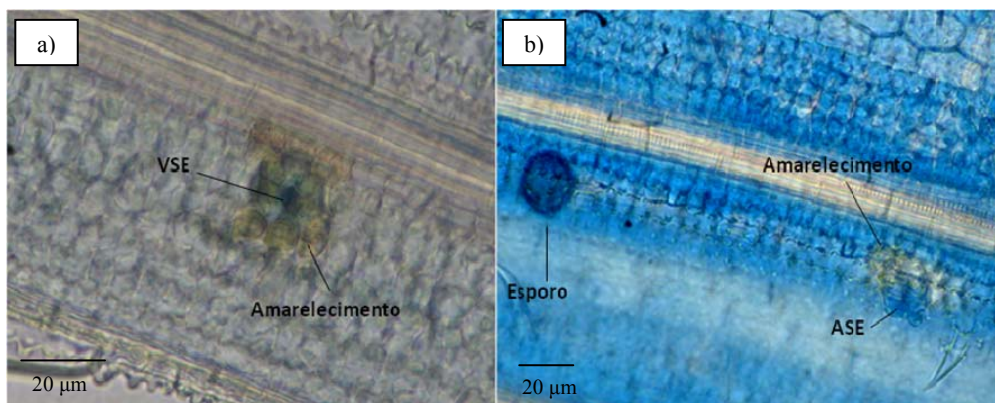


FIGURA 17. Amarelecimento de células do mesófilo de arroz decorrente da formação de apressórios de *Puccinia triticina* sobre estômatos, em fase de plântula. a) Irga 417, 120 hai, A= 400x e b) Nippon Bare, 240 hai, A= 200x. Apressório sobre estômato= ASE; vesícula sub-estomatal= VSE. Porto Alegre, RS. 2011.

Os genótipos diferiram quanto à proporção de HFs formadas (Figura 18). Em 48 hai, BRS 194 e URS 22 apresentaram taxas similares, de 75 e 69%, respectivamente. Em BRS 195 esta taxa foi de 47%, enquanto que em arroz, nenhuma HF foi formada ( $P=0,0029$ ). Em 120 hai, BRS 194 apresentou a maior taxa de formação de HFs (96%), seguido de BRS 195 (65%) e URS 22 (53%). Novamente, não se verificaram HFs nos genótipos de arroz ( $P=0,0005$ ) (Tabela 5).

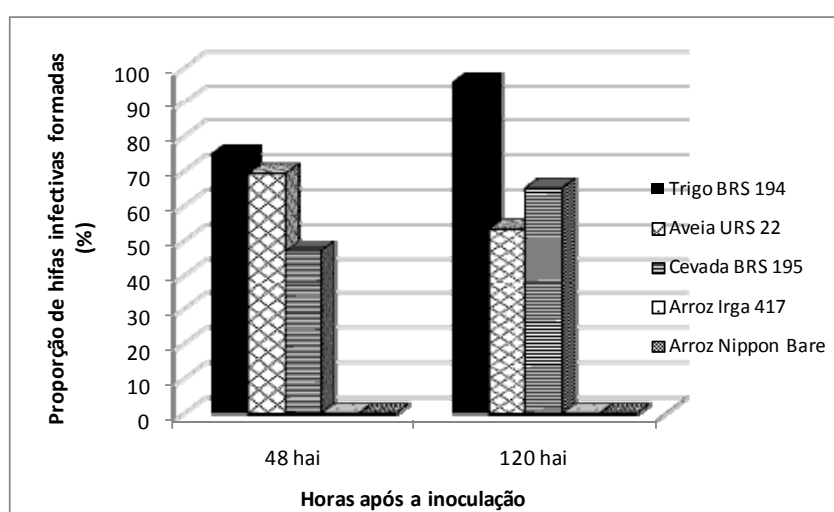


FIGURA 18. Proporção de hifas infectivas de *Puccinia triticina* formadas em diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 horas após a inoculação, em relação ao número de vesículas sub-estomatais formadas, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.

TABELA 5. Diferenciação de hifas infectivas de *Puccinia triticina* em diferentes espécies de Poaceae, na fase de plântula, em 48 e 120 hai. Porto Alegre, RS. 2011.

Horário	Genótipo				
	BRS 194 (trigo)	URS 22 (aveia)	BRS 195 (cevada)	Irga 417 (arroz)	Nippon Bare (arroz)
48 hai	75 a*	69,23 a	47,05 ab	0 b	0 b
120 hai	96 a	53,33 a	65 a	0 b	0 b
Médias	85,5	61,3	56,03	0	0
CV= 17%					

\*Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%.

A maior proporção de HFs que originaram CMHs foi verificada em BRS194, em ambos os horários (95-100%) (Figura 19). Em URS 22 a proporção variou de 66-100% e em BRS 195 de 41-77%. Nos genótipos de arroz não se verificou a formação destas estruturas. A proporção de CMHs formadas aumentou entre 48 e 120 hai, reduzindo as diferenças entre os genótipos ( $P= 0,0470$  e  $P=<0,001$ , respectivamente) (Tabela 6).

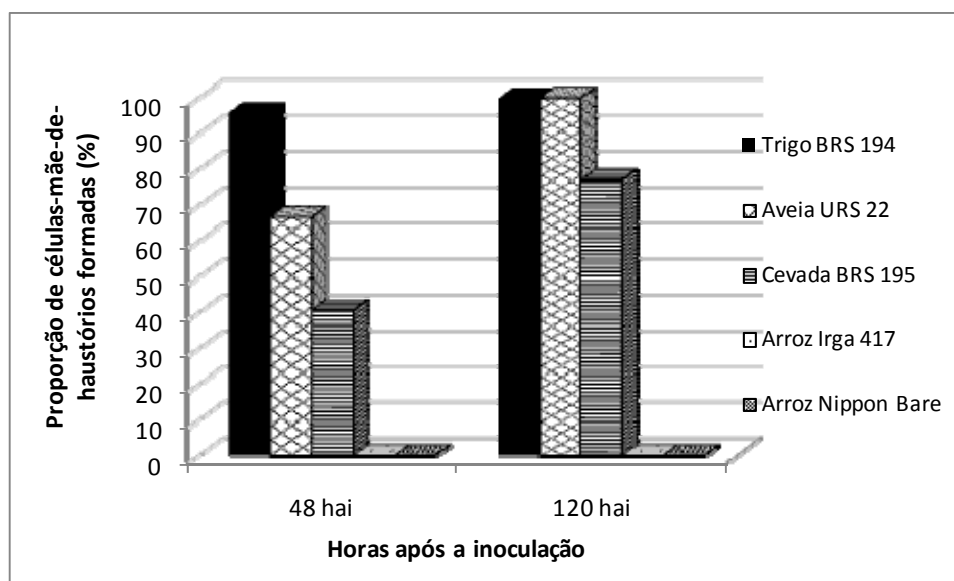


FIGURA 19. Proporção de células-mãe-de-haustórios de *Puccinia triticina* formadas em diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 horas após a inoculação, em relação ao número de hifas infectivas formadas, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.

TABELA 6. Diferenciação de células-mãe-de-haustórios de *Puccinia triticina* em diferentes espécies de Poaceae, na fase de plântula, em 48 e 120 hai. Porto Alegre, RS. 2011.

Horário	Genótipo				
	BRS 194 (trigo)	URS 22 (aveia)	BRS 195 (cevada)	Irga 417 (arroz)	Nippon Bare (arroz)
48 hai	95,83 a*	66,66 ab	40,62 b	0 c	0 c
120 hai	100 a	100 a	76,92 a	0 b	0 b
Médias	97,92	83,33	58,77	0	0
CV= 15,91%					

\*Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%.

A formação de haustórios foi observada somente nos genótipos BRS 194 e BRS 195, em ambos os horários. No entanto, a taxa de formação diferiu entre estes, tanto em 48 hai ( $P=0,0003$ ) como em 120 hai ( $P=<0,0001$ ). Em BRS 194 a taxa variou de 91-100%, enquanto que em BRS 195 não ultrapassou 10%. Nos genótipos de aveia e arroz não se observou a formação de haustórios (Figura 20 e Tabela 7).

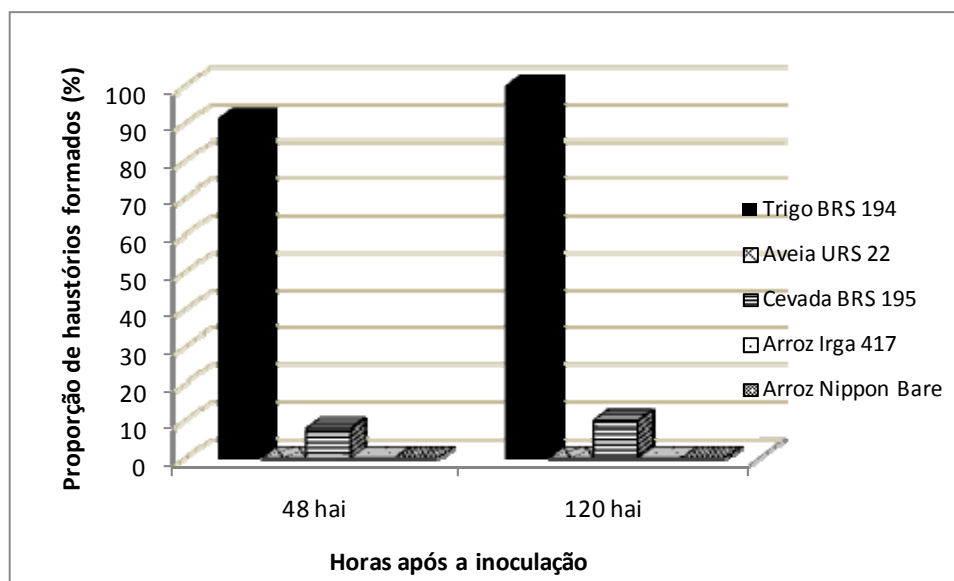


FIGURA 20. Proporção de haustórios de *Puccinia triticina* formados em diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 horas após a inoculação, em relação ao número de células-mãe-de-haustórios formadas, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.

TABELA 7. Diferenciação de haustórios de *Puccinia triticina* em diferentes espécies de Poaceae, na fase de plântula, em 48 e 120 hai. Porto Alegre, RS. 2011.

Horário	Genótipo				
	BRS 194 (trigo)	URS 22 (aveia)	BRS 195 (cevada)	Irga 417 (arroz)	Nippon Bare (arroz)
48 hai	91,3 a	0 b	7,69 b	0 b	0 b
120 hai	100 a	0 b	10 b	0 b	0 b
Médias	95,6	0	8,8	0	0
<b>CV= 30%</b>					

\*Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%.

Em 120 hai, 92% dos haustórios observados estiveram associados a colônias de *P. triticina* estabelecidas, com intenso crescimento de hifas intercelulares. Este valor não necessariamente se refletirá no número de pústulas observadas, visto que mais de um haustório compõe uma pústula.

A partir do número de colônias estabelecidas, calculou-se a proporção de formação de tecido esporogênico. Este tecido foi identificado pela diferenciação do micélio de *P. triticina* dentro dos tecidos do hospedeiro, que tem seu volume aumentado, originando células vacuolizadas que se diferenciam em esporos imaturos e maduros, em fase anterior ao rompimento da epiderme (Figura 21).

Em BRS 194, 18% das colônias estabelecidas 120 hai apresentaram a formação de tecido esporogênico. Os demais genótipos não apresentaram nenhuma colônia neste horário tampouco, tecido esporogênico (Figura 22).

A infecção por *P. triticina* foi paralisada em momentos distintos em cada espécie de Poaceae testada na fase de plântula. Essa diferenciação temporal e espacial na resistência é representada na Figura 23.

A partir dos dados obtidos no experimento com plântulas, foram construídos gráficos que apresentam a redução sequencial na formação de estruturas de *P. triticina*, bem como, o número potencial de colônias estabelecidas, considerando que 1000 esporos se depositem sobre as folhas das diferentes espécies de Poaceae (Figuras 24, 25

e 26). O número de colônias foi calculado considerando-se 25% do número de CMHs formadas, visto que estas podem originar mais de um haustório. Além disso, diferentes haustórios compõem uma única colônia em plantas suscetíveis.

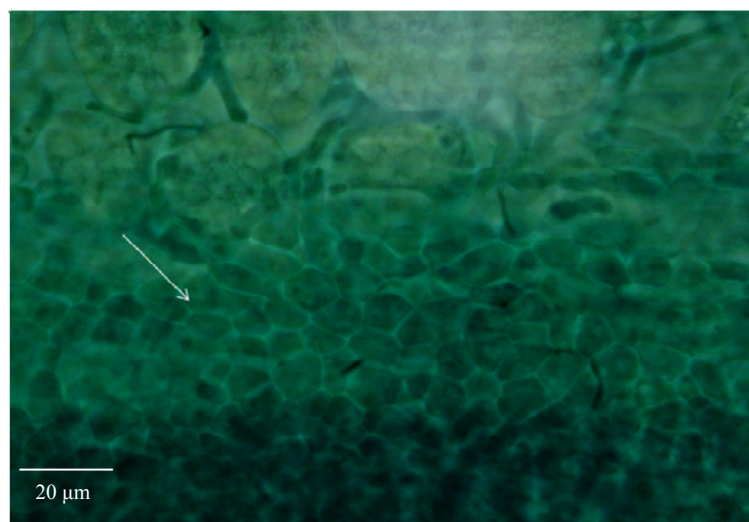


FIGURA 21. Formação de tecido esporogênico de *Puccinia triticina* no mesófilo do genótipo de trigo BRS 194, na fase de plântula, 120 horas após a inoculação. A seta indica a diferenciação de tecido esporogênico. A= 400x. Porto Alegre, RS. 2011.

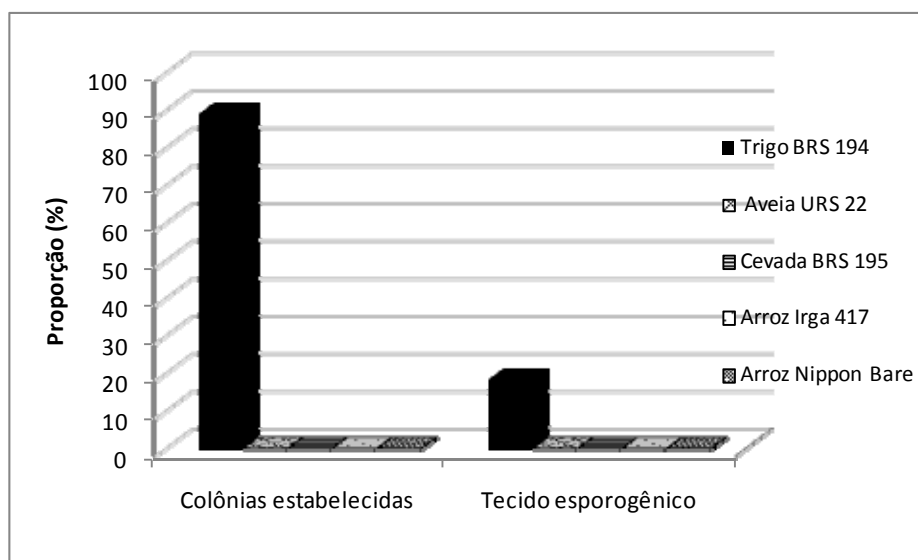


FIGURA 22. Proporção de colônias de *Puccinia triticina* estabelecidas e de formação de tecido esporogênico, 120 horas após a inoculação, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.

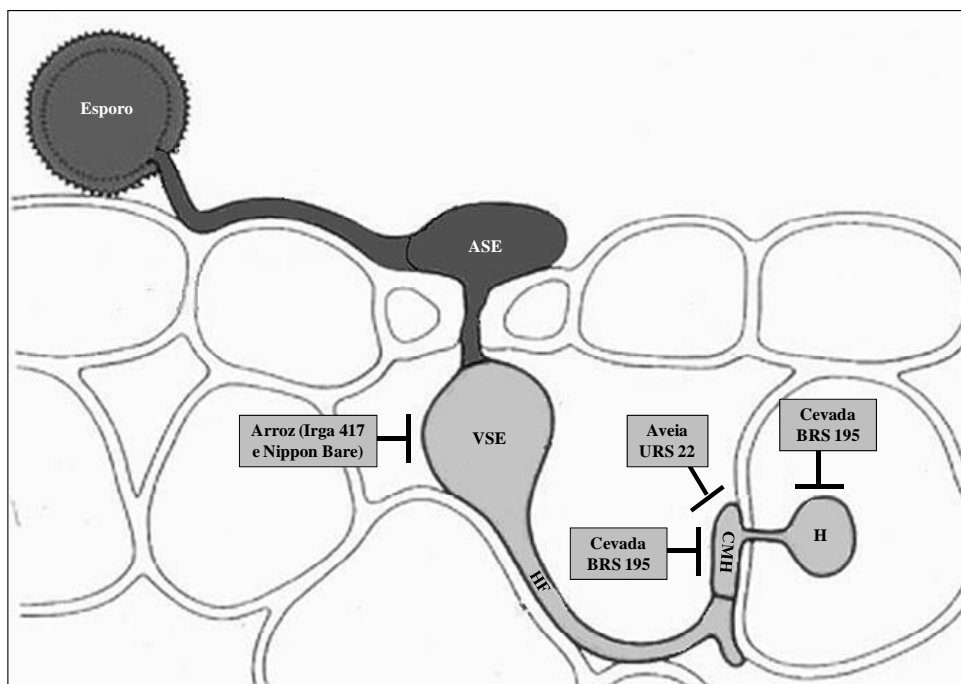


FIGURA 23. Restrição da infecção por *Puccinia triticina* em diferentes espécies de Poaceae, na fase de plântula. As setas indicam em que momento a infecção foi paralisada. Apressório sobre estômato= ASE; vesícula subestomal= VSE; hifa infectiva= HF; célula-mãe-de-haustótio= CMH; haustório= H. Porto Alegre, RS. 2011.

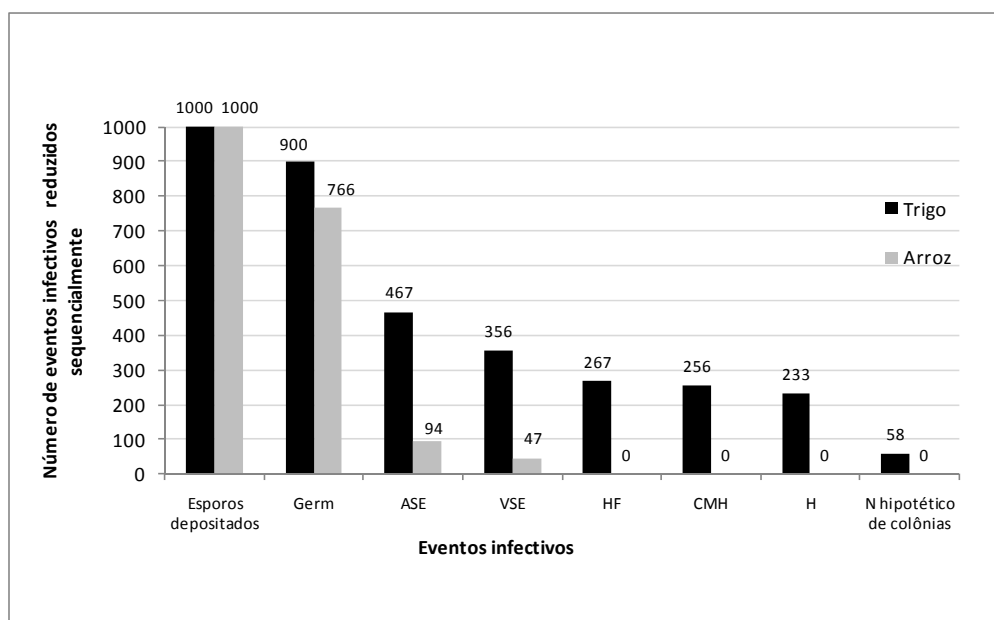


FIGURA 24. Número potencial de colônias de *Puccinia triticina* formadas em espécie hospedeira (trigo) e não-hospedeira (arroz), na fase de plântula, restritas sequencialmente aos eventos infectivos, a partir de um número hipotético de 1000 esporos depositados por planta. Porto Alegre, RS. 2011.



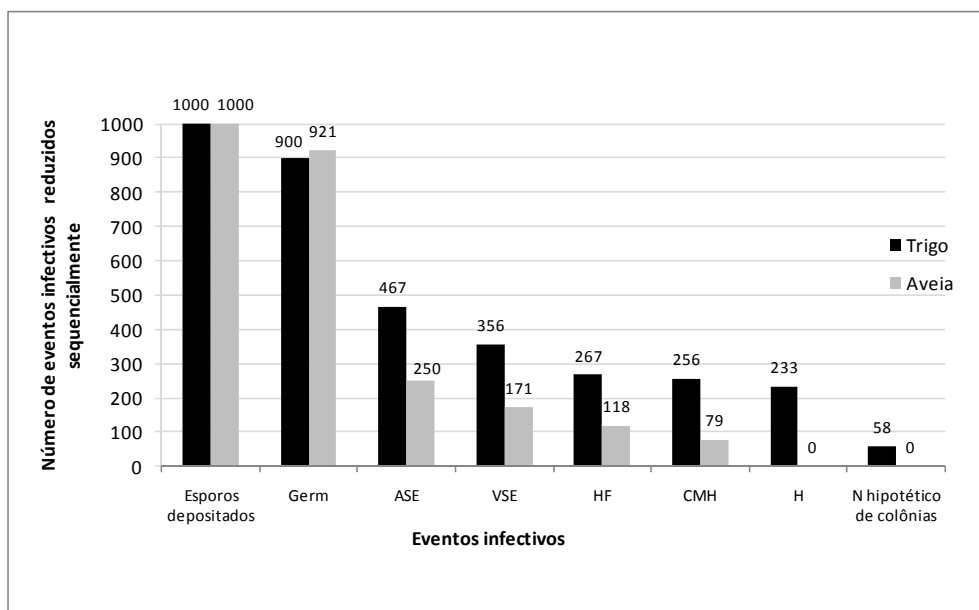


FIGURA 25. Número potencial de colônias de *Puccinia triticina* formadas em espécie hospedeira (trigo) e não-hospedeira (aveia), na fase de plântula, restritas sequencialmente aos eventos infecciosos, a partir de um número hipotético de 1000 esporos depositados por planta. Porto Alegre, RS. 2011.

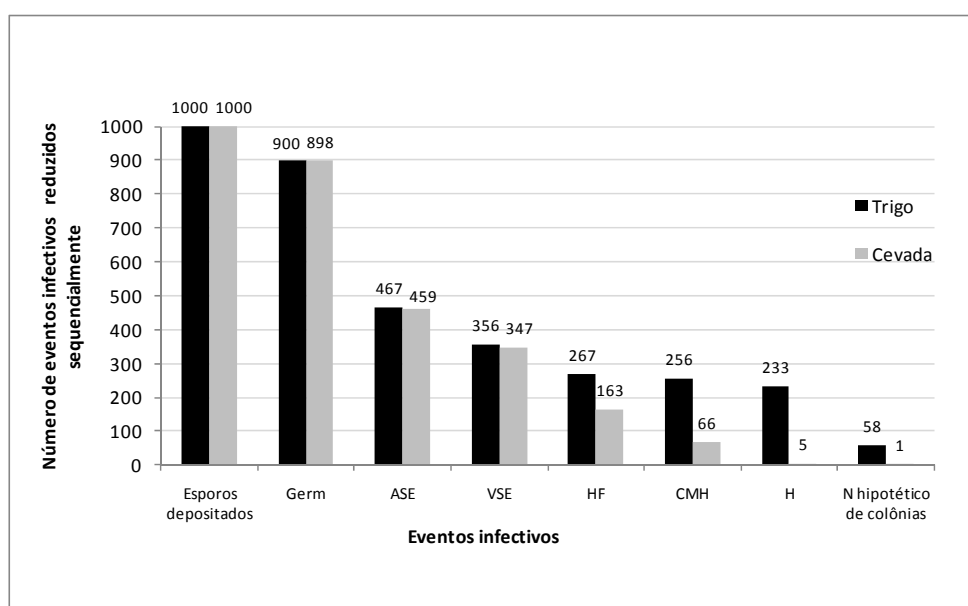


FIGURA 26. Número potencial de colônias de *Puccinia triticina* formadas em espécie hospedeira (trigo) e não-hospedeira (cevada), na fase de plântula, restritas sequencialmente aos eventos infecciosos, a partir de um número hipotético de 1000 esporos depositados por planta. Porto Alegre, RS. 2011.

### 5.1.3 Avaliações na fase de planta adulta

Após ser feita a análise da reação histológica nos horários iniciais da infecção por *P. triticina* das cultivares Toropi e BRS 194, foram feitas análises em horários mais avançados da infecção. Nestas análises, incluíram-se os genótipos: *Lr9* (trigo), BRS 195 (cevada), Nippon Bare e Irga 417 (arroz). *Lr9* é uma linhagem isogênica portadora do gene de resistência qualitativa *Lr9*, desta forma, foi considerada uma testemunha para a reação de resistência total, baseada em hipersensibilidade. Os demais genótipos foram inseridos para avaliação da reação de resistência de não-hospedeiros na fase de planta adulta.

Em 48 hai, a proporção de esporos germinados sobre as folhas não diferiu entre os distintos genótipos, sendo em média, de 55% ( $P=0,1604$ ) (Figura 27). Em 120 hai os genótipos diferiram quanto à proporção de esporos germinados, com uma taxa máxima de 80%, em BRS 194 e mínima de 31,8%, em Nippon Bare ( $P=0,0205$ ) (Tabela 8).

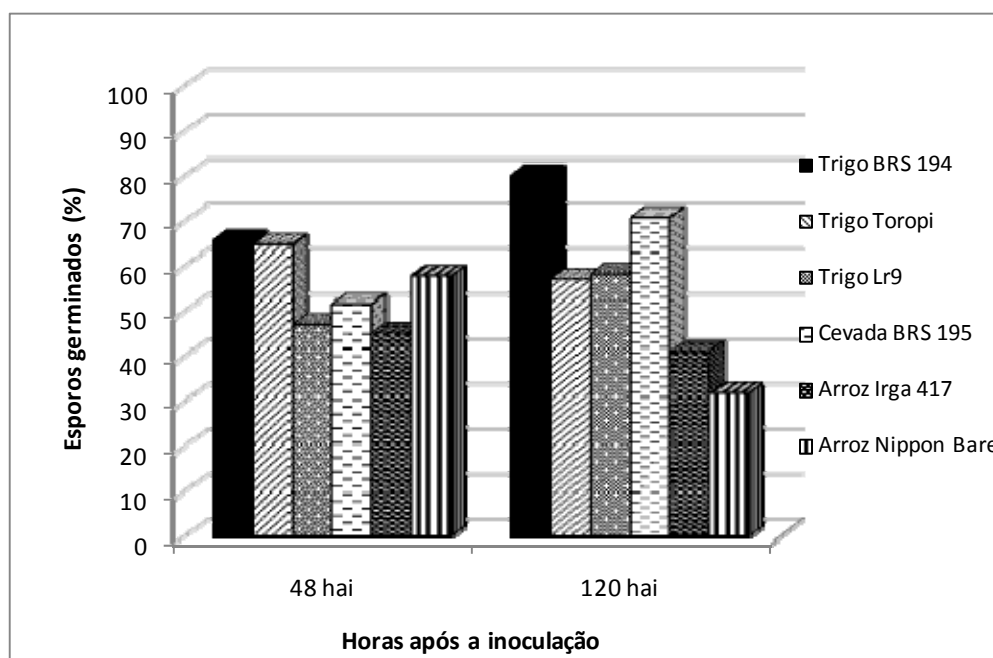


FIGURA 27. Proporção de esporos de *Puccinia triticina* germinados sobre folhas de diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 hai, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.

TABELA 8. Germinação de esporos de *Puccinia triticina* sobre folhas de diferentes espécies de Poaceae, 48 e 120 hai, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.

Horário	Genótipo					
	BRS 194 (trigo)	Toropi (trigo)	Lr9 (trigo)	BRS 195 (cevada)	Irga 417 (arroz)	Nippon Bare (arroz)
48 hai	65,7 a*	64,8 a	47,1 a	51,6 a	45,1 a	57,9 a
120 hai	80,1 a	57,1 ab	58,3 ab	70,9 ab	41 ab	31,8 b
Médias	72,9	61	52,7	61,3	43,1	44,8
<b>CV= 19,19%</b>						

\*Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%.

Houve diferença significativa entre os genótipos quanto à proporção de esporos germinados que formaram ASEs em 48 ( $P < 0,0001$ ) e 120 hai ( $P = 0,0182$ ). A taxa de formação de ASEs foi similar entre os genótipos BRS 194 e *Lr9* em ambos os horários (Figura 28). Em Toropi a taxa de formação de apressórios manteve-se constante entre os diferentes horários, permanecendo em torno de 7,5%. As menores taxas foram observadas em não-hospedeiros, destacando-se o genótipo de arroz Nippon Bare, onde não foi verificada a formação de ASEs (Tabela 9).

À exemplo do que foi verificado para a taxa de germinação de esporos, houve aumento na formação de ASEs no decorrer do tempo, o que leva a crer que nem todos os esporos germinam e formam apressórios nas primeiras horas após a inoculação. Alguns esporos têm seu desenvolvimento atrasado e diferenciam tubos germinativos várias horas após o contato com a folha. O mesmo parece ocorrer com esporos que diferenciam apressórios posteriormente.

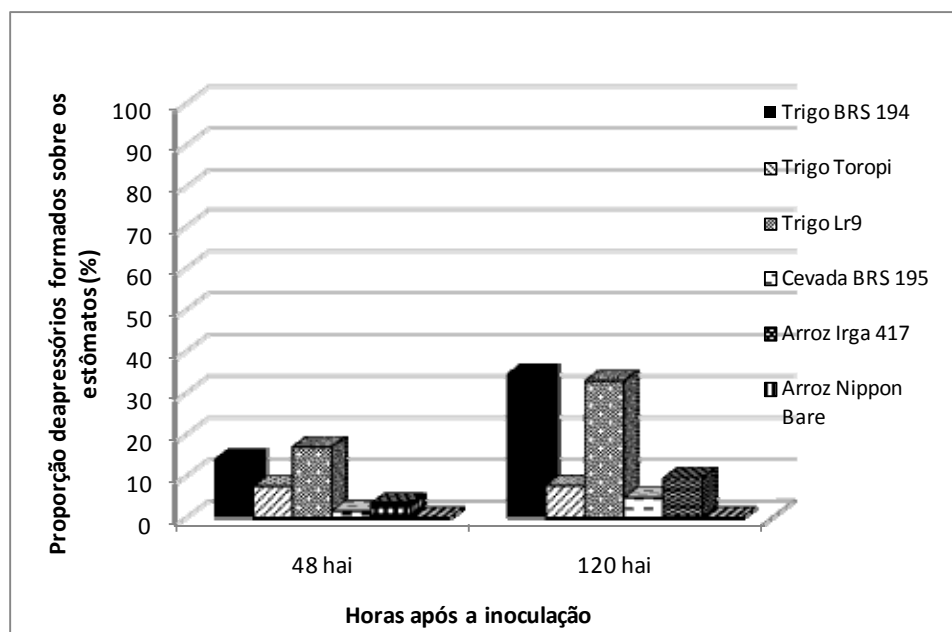


FIGURA 28. Proporção de apressórios de *Puccinia triticina* formados sobre estômatos de diferentes espécies de Poaceae em 48 e 120 hai, em relação ao número de esporos germinados, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.

TABELA 9. Diferenciação de apressórios de *Puccinia triticina* sobre estômatos de diferentes espécies de Poaceae, 48 e 120 hai, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.

Horário	Genótipo					
	BRS 194 (trigo)	Toropi (trigo)	Lr9 (trigo)	BRS 195 (cevada)	Irga 417 (arroz)	Nippon Bare (arroz)
48 hai	14,2 ab*	7,5 bc	17 a	1,6 c	3,4 c	0 c
120 hai	34,6 a	7,7 ab	32,8 a	4,8 ab	9,5 ab	0 b
Médias	24,4	7,6	24,4	3,2	6,5	0
CV= 4,64%						

\*Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%.

Os genótipos diferiram em relação ao número de VSEs formadas em 48 ( $P=0,0073$ ) e 120 hai ( $P=0,0008$ ). Em 48 hai, os genótipos com maior proporção de VSEs diferenciadas foram BRS 194 (55%) e BRS 195 (50%). Toropi e Lr9 apresentaram uma proporção similar, próxima de 20%, enquanto que nos genótipos de arroz não foram verificadas VSEs (Figura 29). A taxa apresentada por BRS 195 foi superestimada, pois apenas dois ASEs foram formados, sendo que um deles diferenciou VSE.

Às 120 hai, BRS 194 e Toropi apresentaram proporções similares de VSEs, próximas de 35%. O destaque foi *Lr9*, com 81% dos ASEs diferenciando VSEs. Neste horário, não houve diferenciação de VSEs nos genótipos não-hospedeiros (Tabela 10).

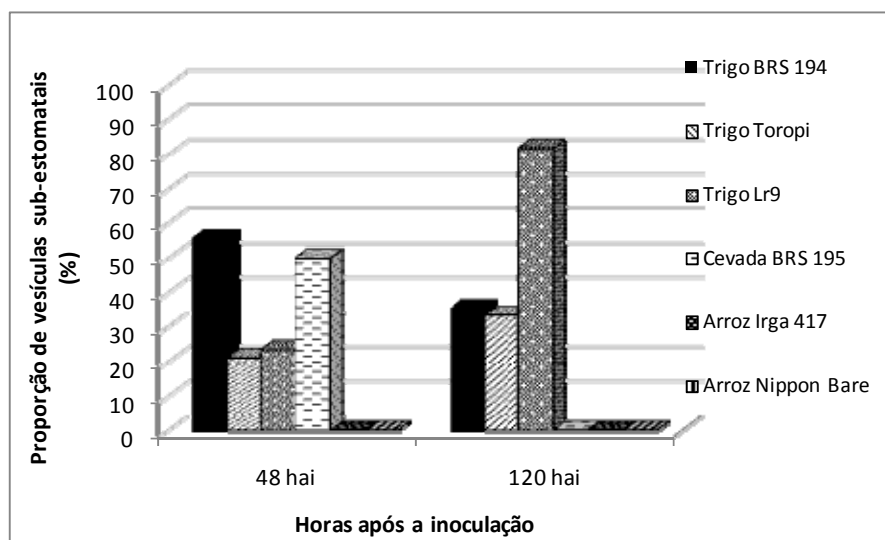


FIGURA 29. Proporção de vesículas sub-estomatais de *Puccinia triticina* formadas em diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 hai, em relação ao número de apressórios formados sobre estômatos, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.

TABELA 10. Diferenciação de vesículas sub-estomatais de *Puccinia triticina* em diferentes espécies de Poaceae, 48 e 120 hai, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.

Horário	Genótipo					
	BRS 194 (trigo)	Toropi (trigo)	<i>Lr9</i> (trigo)	BRS 195 (cevada)	Irga 417 (arroz)	Nippon Bare (arroz)
48 hai	55,87 a*	21,24 ab	23,54 ab	50 a	0 b	0 b
120 hai	35,67 b	33,33 b	81,81 a	0 c	0 c	0 c
<b>Médias</b>	46	27	53	25	0	0
<b>CV= 7,55%</b>						

\*Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%.

Em 48 hai, *Lr9* apresentou a maior taxa de formação de HFs (50%), seguido de BRS 194 (26%) e Toropi (14%) ( $P=0,0008$ ) (Figura 30). Às 120 hai, a diferença na taxa de formação de HFs entre os genótipos também foi significativa ( $P=0,0040$ ). Em BRS 194 e *Lr9* a proporção de VSEs que diferenciaram HFs foi superior a 80%. Nos demais

genótipos não houve formação de HFs (Tabela 11).

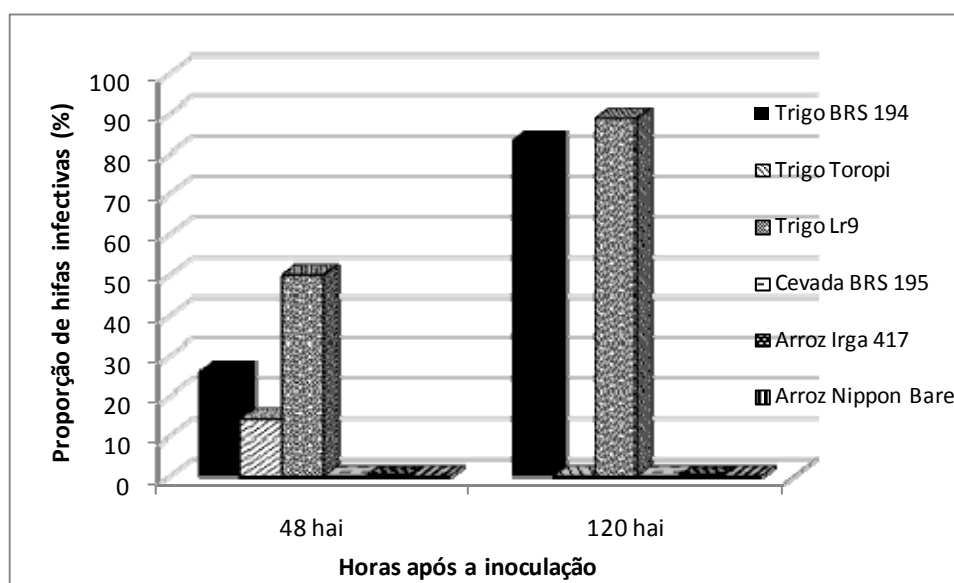


FIGURA 30. Proporção de hifas infectivas de *Puccinia triticina* formadas em diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 hai, em relação ao número de vesículas sub-estomatais formadas, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.

TABELA 11. Diferenciação de hifas infectivas de *Puccinia triticina* em diferentes espécies de Poaceae, 48 e 120 hai, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.

Horário	Genótipo					
	BRS 194 (trigo)	Toropi (trigo)	Lr9 (trigo)	BRS 195 (cevada)	Irga 417 (arroz)	Nippon Bare (arroz)
48 hai	26,3 ab*	14,3 b	50 a	0 b	0 b	0 b
120 hai	83,3 a	0 b	88,9 a	0 b	0 b	0 b
Médias	54,8	7,1	69,4	0	0	0

CV= 25,73%

\*Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%.

A ausência de HFs em Toropi (120 hai) pode ser atribuída à amostragem. Como a taxa de formação desta estrutura parece ser pequena neste genótipo, é provável que as amostras analisadas ao acaso em 120 hai não apresentaram formação de HFs. Ainda, algum composto produzido pela planta pode estar atuando na desintegração desta estrutura em horários mais avançados da infecção.

A formação de células-mãe-de-haustórios (CMHs) só ocorreu nos genótipos

BRS 194 e *Lr9* (Figura 31). Em 48 hai, a taxa foi superior em *Lr9* (100%) do que em BRS194 (60%) ( $P=0,0261$ ). Em 120 hai, ambos os genótipos apresentaram taxas de diferenciação de CMHs superiores a 90% ( $P=0,0001$ ) (Tabela 12).

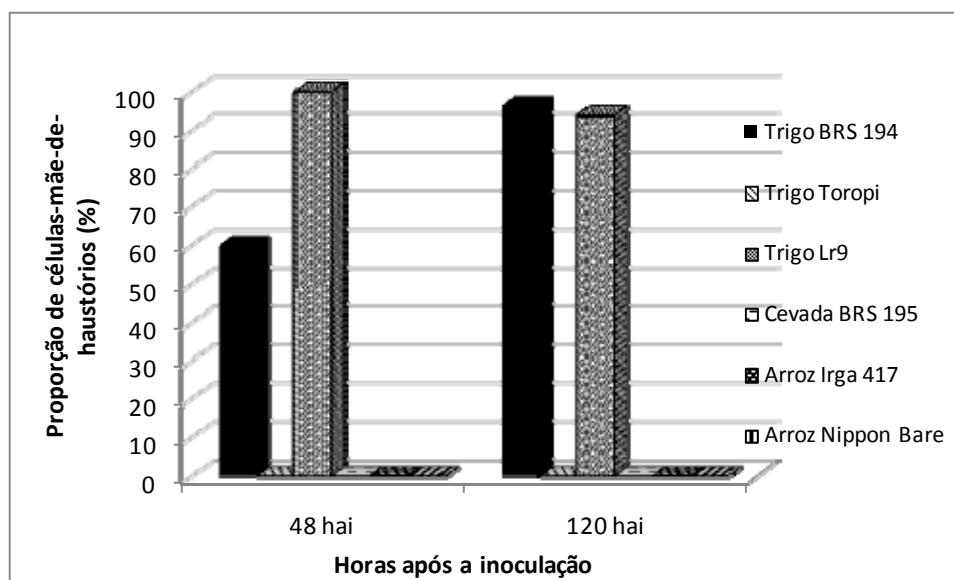


FIGURA 31. Proporção de células-mãe-de-haustórios de *Puccinia triticina* formadas em diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 hai, em relação ao número de hifas infectivas formadas, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.

TABELA 12. Diferenciação de células-mãe-de-haustórios de *Puccinia triticina* em diferentes espécies de Poaceae, 48 e 120 hai, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.

Horário	Genótipo					
	BRS 194 (trigo)	Toropi (trigo)	<i>Lr9</i> (trigo)	BRS 195 (cevada)	Irga 417 (arroz)	Nippon Bare (arroz)
48 hai	60 ab*	0 b	100 a	0 b	0 b	0 b
120 hai	96,4 a	0 b	93,8 a	0 b	0 b	0 b
Médias	78	0	97	0	0	0
<b>CV= 24,43%</b>						

\*Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%.

A proporção de CMHs que diferenciaram haustórios foi similar entre os genótipos BRS 194 e *Lr9* (Figuras 32 e 33). Em 48 hai, *Lr9* apresentou uma taxa de 100%, enquanto que em BRS 194 esta taxa foi de 67% ( $P<0,0001$ ). Em 120 hai, 98% das CMHs observadas em BRS 194 diferenciaram haustórios. Em *Lr9* esta taxa foi de

87%. Nos demais genótipos não foram observados haustórios ( $P < 0,0001$ ) (Tabela 13).

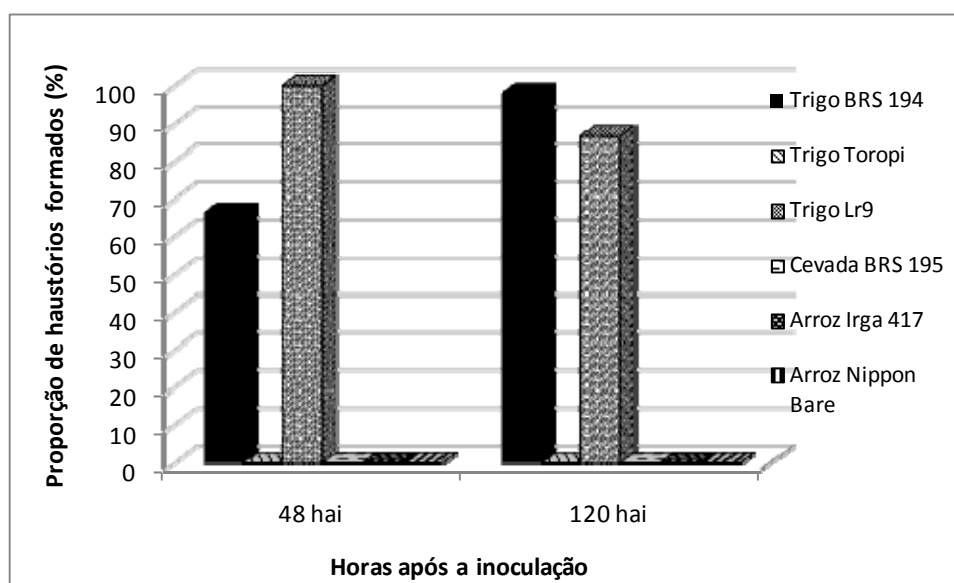


FIGURA 32. Proporção de haustórios de *Puccinia triticina* formados em diferentes espécies de Poaceae, em 48 e 120 hai, em relação ao número de células-mãe-de-haustórios formadas, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS, 2011.

TABELA 13. Diferenciação de haustórios de *Puccinia triticina* em diferentes espécies de Poaceae, 48 e 120 hai, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS, 2011.

Horário	Genótipo					
	BRS 194 (trigo)	Toropi (trigo)	Lr9 (trigo)	BRS 195 (cevada)	Irga 417 (arroz)	Nippon Bare (arroz)
48 hai	67 a*	0 b	100 a	0 b	0 b	0 b
120 hai	98,1 a	0 b	86,7 a	0 b	0 b	0 b
<b>Médias</b>	82	0	93	0	0	0
<b>CV= 23%</b>						

\*Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%.

Em BRS 194, 240 hai, 88% dos haustórios observados estiveram associados à colônias de *P. triticina* estabelecidas, com intenso crescimento de hifas intercelulares. Em Toropi, esta taxa foi de apenas 16% (Figura 34).

A diferenciação de tecido esporogênico na fase de planta adulta foi observada somente em 240 hai. Em plântulas esta diferenciação ocorreu em 120 hai. Acredita-se que este atraso seja em decorrência da estrutura dos tecidos, visto que em planta adulta



a epiderme é mais rígida e coriácea, podendo ser menos permissiva do que em plântulas.

No genótipo suscetível BRS 194, 240 hai, 32% das colônias haviam diferenciado tecido esporogênico, em contraste com apenas 9% das colônias, em Toropi.

O genótipo de trigo *Lr9* não apresentou formação colônias, tampouco de tecido esporogênico. Da mesma forma, nenhum dos genótipos não-hospedeiros diferenciou estas estruturas no interior de seus tecidos.

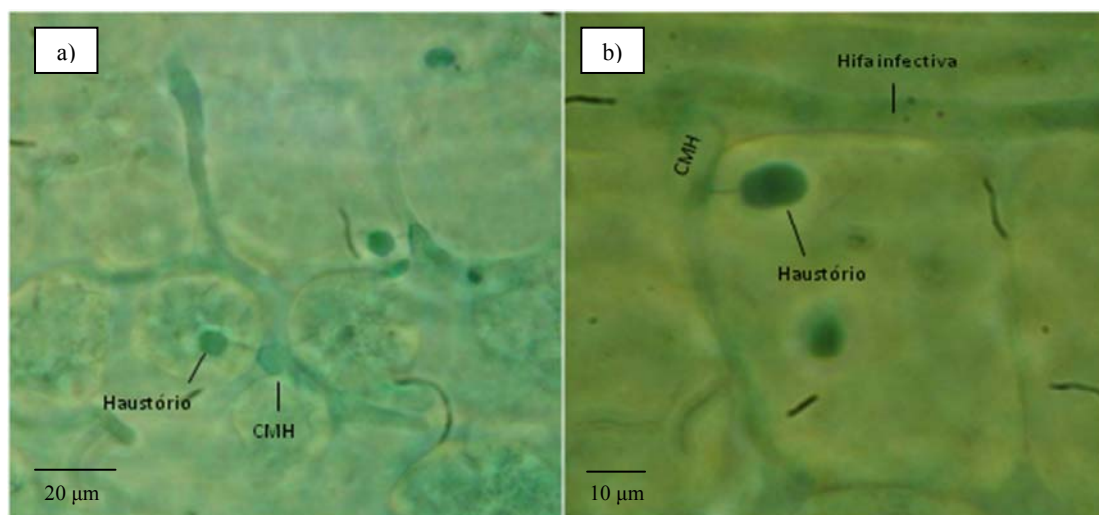


FIGURA 33. Colonização dos tecidos por *Puccinia triticina* no genótipo de trigo BRS 194, na fase de planta adulta, 120 hai. a) Hifas intercelulares, células-mãe-de-haustórios (CMHs) e haustórios, A= 400x; b) Célula do mesófilo contendo haustório em seu interior, A=1000x. Porto Alegre, RS. 2011.

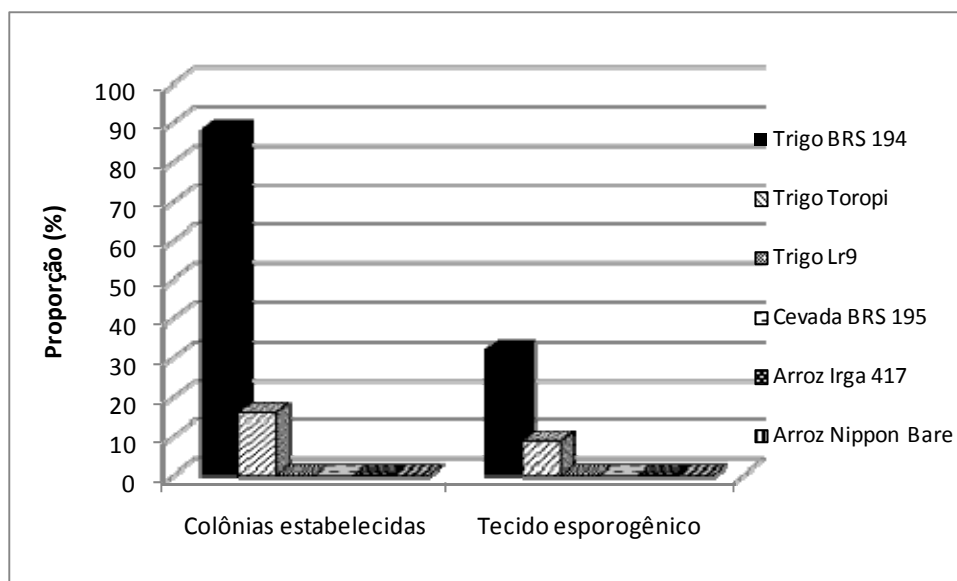


FIGURA 34. Proporção de colônias de *Puccinia triticina* estabelecidas e associadas à formação de tecido esporogênico, 240 hai, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.

As amostras coletadas do genótipo de trigo Toropi, 240 hai, incluíram segmentos de tecido de regiões com e sem a presença de pústulas. Pôde-se perceber que nas regiões de Toropi em que as pústulas são formadas, a diferenciação de estruturas fúngicas ocorre de forma similar ao que é observado no genótipo suscetível BRS 194, com intenso crescimento de hifas intercelulares e diversos haustórios. Já nas regiões da folha em que não são observadas pústulas, algumas tentativas de infecção estão associadas à morte celular. Houve ainda, a observação de locais com presença de diversas hifas e sem a formação de haustórios (Figura 35). Porém, grande parte das tentativas observadas parece ser paralisada nas fases iniciais do processo infeccioso, em um mecanismo de resistência pré-haustorial.

Com base nos resultados observados neste experimento, percebe-se que os genótipos de trigo BRS 194 e *Lr9* comportam-se de forma similar até a formação de haustórios, embora um possua suscetibilidade e outro resistência à raça de *P. triticina* utilizada no estudo. Isto ocorre porque a resistência de *Lr9* é pós-haustorial e por isso, até que os haustórios sejam formados no interior dos tecidos da planta, o genótipo é tão

permissivo ou mais permissivo que BRS 194.

A partir da formação de hifas infectivas, o genótipo de trigo Toropi apresentou comportamento similar ao observado nos genótipos não-hospedeiros. Nestes genótipos, tanto em plântulas como em planta adulta, o principal mecanismo de resistência parece ser pré-haustorial, restringindo a diferenciação de estruturas infectivas de *P. triticina* no decorrer do tempo.

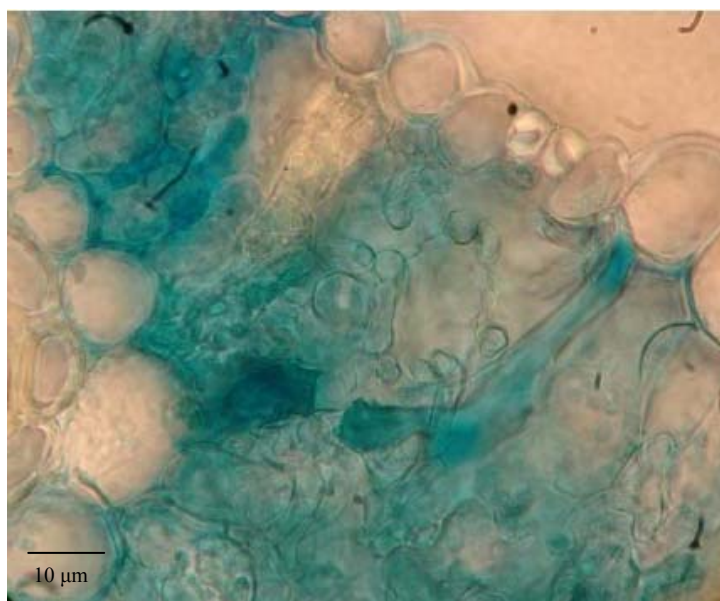


FIGURA 35. Micélio de *Puccinia triticina* na câmara sub-estomática do genótipo de trigo Toropi, na fase planta adulta, 240 hai. Corte de região sem pústulas. A=1000x. Porto Alegre, RS. 2011.

A infecção por *P. triticina* foi paralisada em momentos distintos em cada espécie de Poaceae testada na fase de planta adulta. Houve ainda, diferença no momento em que a resistência foi efetiva nos genótipos de trigo com resistência específica (*Lr9*) e não-específica à raças (Toropi). Essa diferenciação temporal e espacial na resistência é representada na Figura 36.

De acordo com os resultados obtidos no experimento com plantas adultas, foi construído um gráfico que apresenta a redução sequencial na formação de estruturas infectivas de *P. triticina*, bem como, o número potencial de colônias estabelecidas,

considerando que 1000 esporos se depositem sobre as folhas de um genótipo suscetível de trigo e outro com resistência parcial. O número de colônias foi calculado considerando-se 25% do número de CMHs formadas (Figura 37).

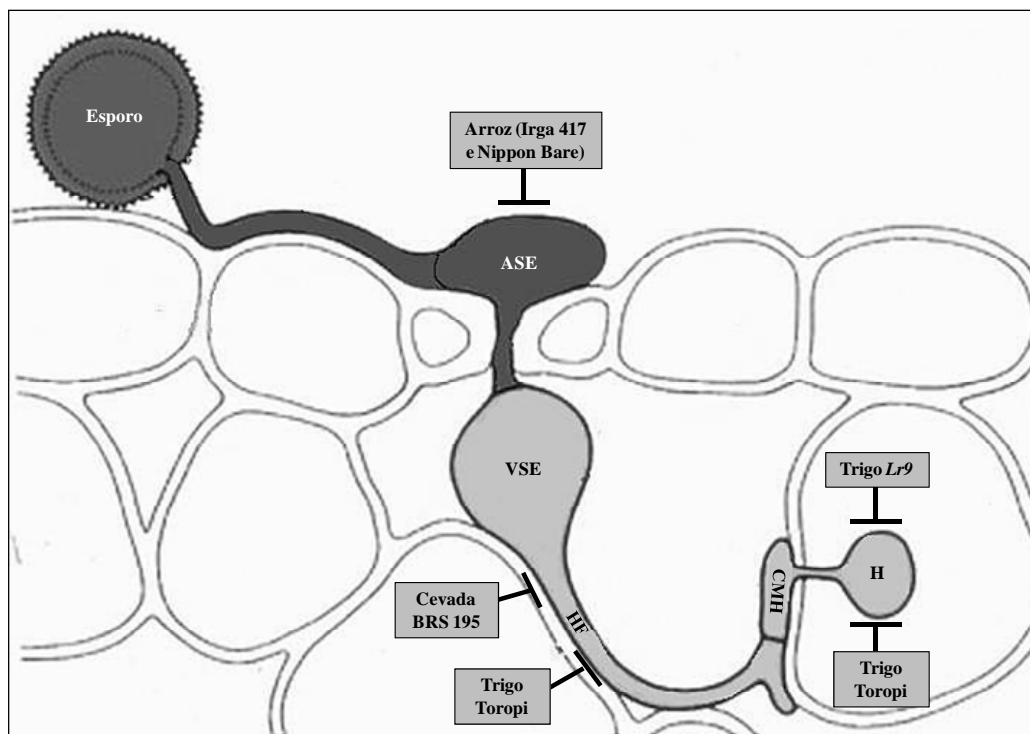


FIGURA 36. Restrição da infecção por *Puccinia triticina* em diferentes espécies de Poaceae, na fase de planta adulta. As setas indicam em que momento a infecção foi paralisada. Apressório sobre estômato= ASE; vesícula subestomal= VSE; hifa infectiva= HF; célula-mãe-de-haustótio= CMH; haustório= H. Porto Alegre, RS. 2011.

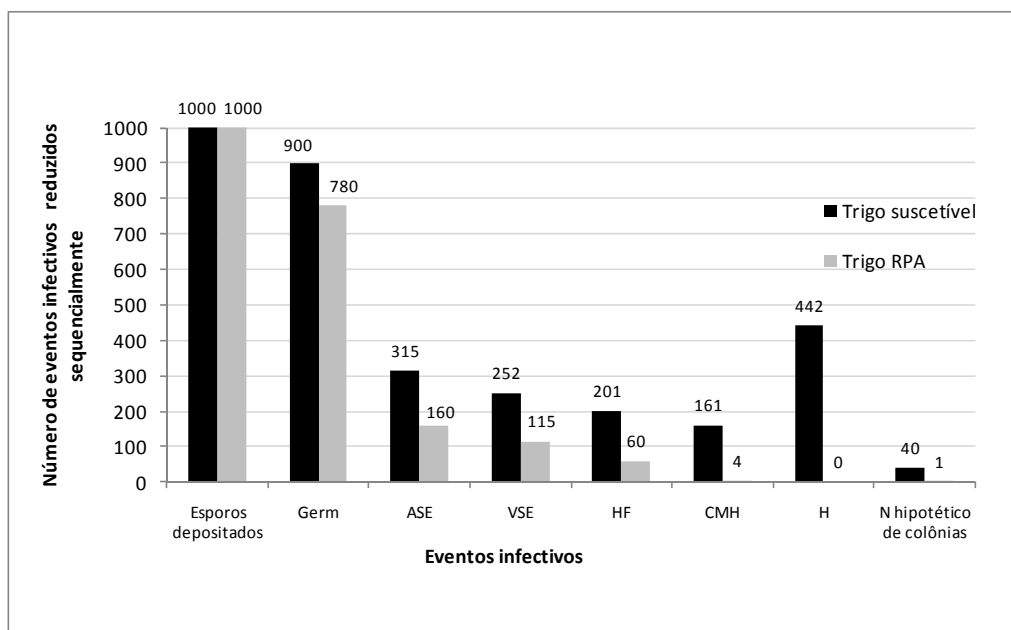


FIGURA 37. Número potencial de colônias de *Puccinia triticina* formadas em genótipo suscetível e com resistência parcial, na fase de planta adulta, restritas sequencialmente aos eventos infectivos, a partir de um número hipotético de 1000 esporos depositados por planta. Porto Alegre, RS. 2011.

## 5.2 Avaliações histológicas e histoquímicas das reações de resistência à ferrugem da folha do trigo em hospedeiros e não-hospedeiros

### 5.2.1 Histopatologia e respostas de defesa

#### a) Ocorrência de morte celular associada a tentativas de colonização

Nos mesmos experimentos onde foram quantificados os eventos infectivos envolvidos no processo de colonização por *P. triticina*, foram feitas observações da presença ou ausência de morte celular associada às tentativas de colonização, nas fases de plântula e planta adulta. Nestes testes, as células mortas foram identificadas, pois coraram intensamente com *Trypan blue*, enquanto as demais células adquiriram uma coloração levemente azulada.

#### a.a) Plântulas

Houve diferença significativa entre os genótipos quanto à ocorrência de morte celular em 48 ( $P=0,0184$ ) e 120 hai ( $P=0,0007$ ). No genótipo de cevada BRS 195 houve

a ocorrência de morte celular em 20% das tentativas de penetração por *P. triticina*, 48 hai. No genótipo de aveia URS 22, em 7,7% dos locais onde houve contato da CMH com a parede celular da planta, verificou-se uma coloração azul mais intensa quando comparada com outras células, porém, bem localizada, não caracterizando a morte da célula como um todo (Figura 38).

Em 120 hai, 80% das tentativas de colonização em cevada estiveram associadas com morte celular. Em aveia, o que se verificou foi um amarelecimento nos locais de contato entre CMH e célula hospedeira, mas sem a ocorrência de morte celular. Nos demais genótipos testados não houve ocorrência de morte celular (Figura 39 e Tabela 14).

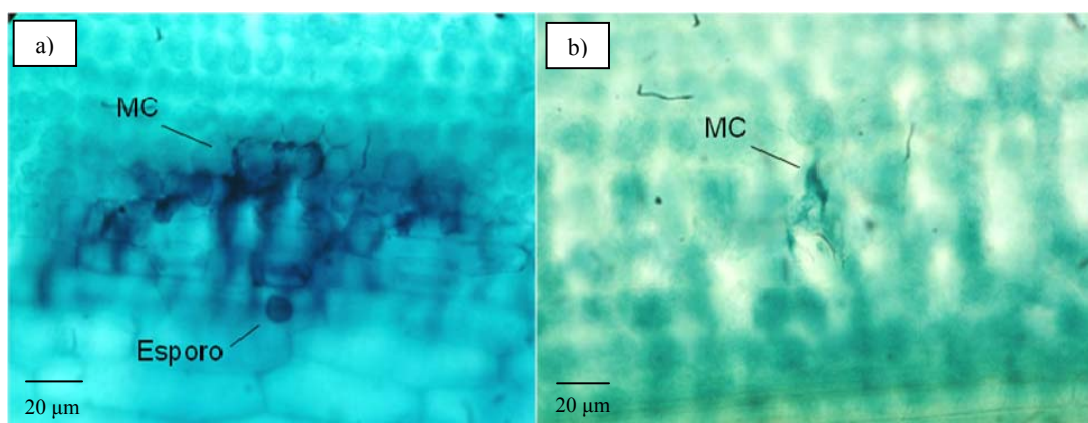


FIGURA 38. Morte celular em resposta à tentativa de colonização por *Puccinia triticina*, na fase de plântula, 48 hai. a) Cevada BRS 195, A= 200x e b) aveia URS 22, A= 400x. MC= morte celular. Porto Alegre, RS. 2011.

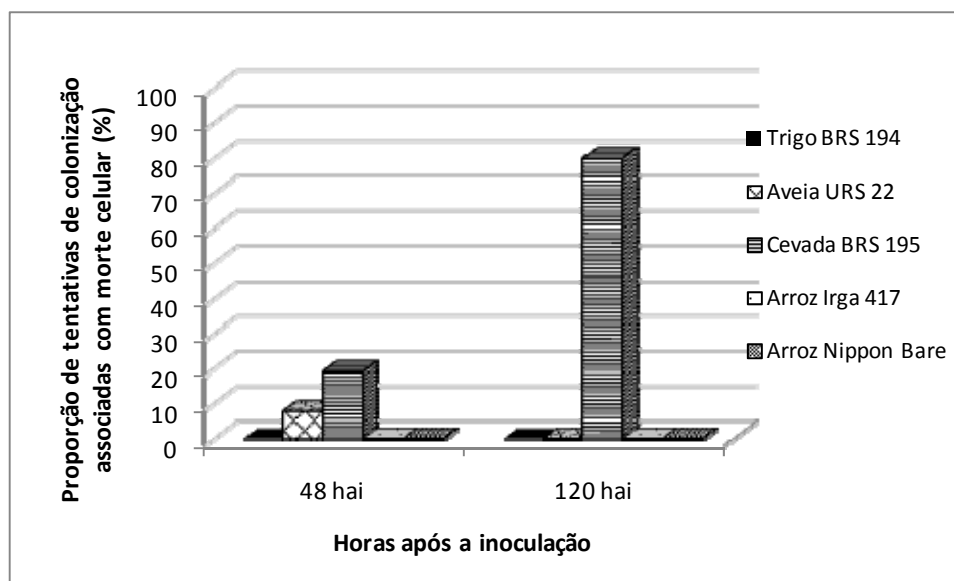


FIGURA 39. Proporção de tentativas de colonização de *Puccinia triticina* associadas com a ocorrência de morte celular em 48 e 120 hai, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.

TABELA 14. Ocorrência de morte celular em resposta à tentativa de infecção por *Puccinia triticina* em diferentes espécies de Poaceae, 48 e 120 hai, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.

Horário	Genótipo				
	BRS 194 (trigo)	URS 22 (aveia)	BRS 195 (cevada)	Irga 417 (arroz)	Nippon Bare (arroz)
48 hai	0 b*	7,7 ab	19,1 a	0 b	0 b
120 hai	0 b	0 b	80 a	0 b	0 b
<b>Médias</b>	0	3,8	49,5	0	0
<b>CV= 4,38%</b>					

\*Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%.

Às 240 hai o genótipo de trigo BRS 194 apresentou diversas pústulas e intensa colonização dos tecidos. A área ocupada pela colônia, definida aqui como o conjunto de hifas intercelulares e demais estruturas fúngicas produzidas, geralmente excedeu a área ocupada pela pústula (sinal visível da infecção pelo patógeno). Em alguns locais houve a ocorrência de células com morte celular associadas a estas pústulas. No entanto, estas foram consideradas efeito da doença e não uma reação de resistência.

No genótipo de cevada BRS 195 também foram visualizadas algumas pústulas. Porém, estas foram de tamanho diminuto, pouco maiores que o tamanho de um

estômato e, muitas vezes, não sendo visíveis a olho nu no momento da coleta. Foi observada também, a ocorrência de células intensamente coradas com *Trypan Blue* ao redor das pústulas, o que caracteriza a morte celular nas mesmas (Figura 40).

Dentre os genótipos testados na fase de plântula, apenas BRS 195 (cevada) apresentou morte celular como mecanismo de resistência à *P. triticina* ( $P=0,0017$ ).

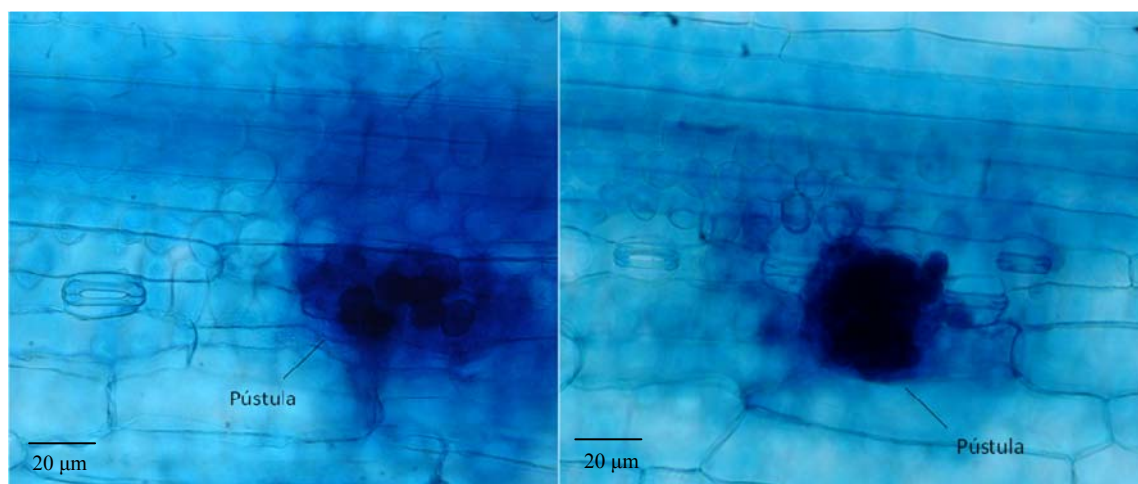


FIGURA 40. Pústulas de *Puccinia triticina* associadas à morte celular, formadas no genótipo de cevada BRS 195, na fase de plântula, 240 hai. A= 200x. Porto Alegre, RS. 2011.

#### **a.b) Planta adulta**

Nas observações realizadas em 48 e 120 hai, a formação de CMHs e haustórios ocorreu apenas nos genótipos de trigo BRS 194 e *Lr9*. Dentre os genótipos que formaram estas estruturas, somente *Lr9* apresentou morte celular (Figura 41) e esta esteve presente em todas as células onde se formaram haustórios ( $P=<0,0001$ ).

A formação de CMHs e haustórios não foi observada no genótipo de trigo Toropi (amostras analisadas em 48 e 120 hai). No entanto, sabe-se que estas estruturas estavam presentes, visto que algumas pústulas são formadas. Mesmo sem a visualização destas estruturas em 120 hai, tanto em 120 como em 240 hai houve a ocorrência de morte celular associada à cerca de 37% das tentativas de colonização (Figuras 42 e 43).



Esta pode ser considerada uma morte celular tardia, visto que diferiu temporalmente da morte celular observada em *Lr9*, que ocorre logo após a formação de haustórios.

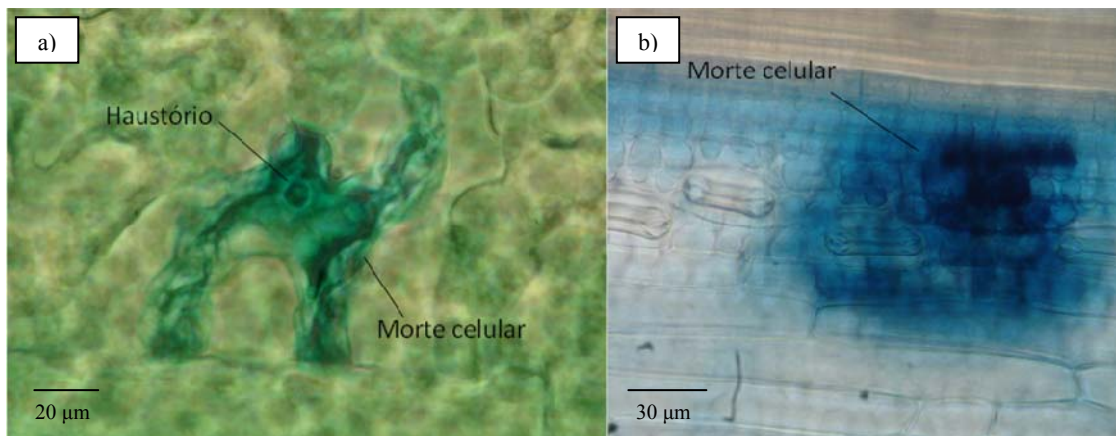


FIGURA 41. Morte celular em decorrência da formação de haustórios no genótipo de trigo *Lr9*, na fase de planta adulta. a) Célula do mesófilo com haustório em seu interior, intensamente corada com *Trypan Blue*, 48 hai, A= 400x; b) Células do mesófilo com morte celular, 120 hai, A= 200x. Porto Alegre, RS. 2011.

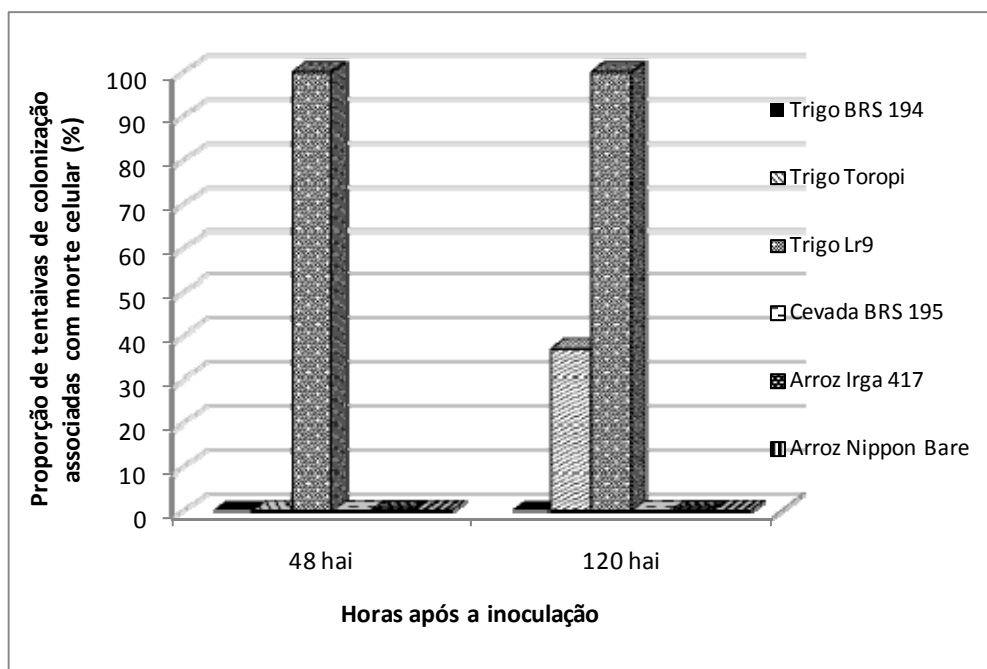


FIGURA 42. Proporção de tentativas de colonização de *Puccinia triticina* associadas com a ocorrência de morte celular em 48 e 120 hai, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.

TABELA 15. Ocorrência de morte celular em resposta à tentativa de infecção por *Puccinia triticina* em diferentes espécies de Poaceae, 48 e 120 hai, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.

Horário	Genótipo					
	BRS 194 (trigo)	Toropi (trigo)	Lr9 (trigo)	BRS 195 (cevada)	Irga 417 (arroz)	Nippon Bare (arroz)
48 hai	0 b*	0 b	100 a	0 b	0 b	0 b
120 hai	0 b	37 ab	100 a	0 b	0 b	0 b
Médias	0	19	100	0	0	0
CV= 10%						

\*Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%.

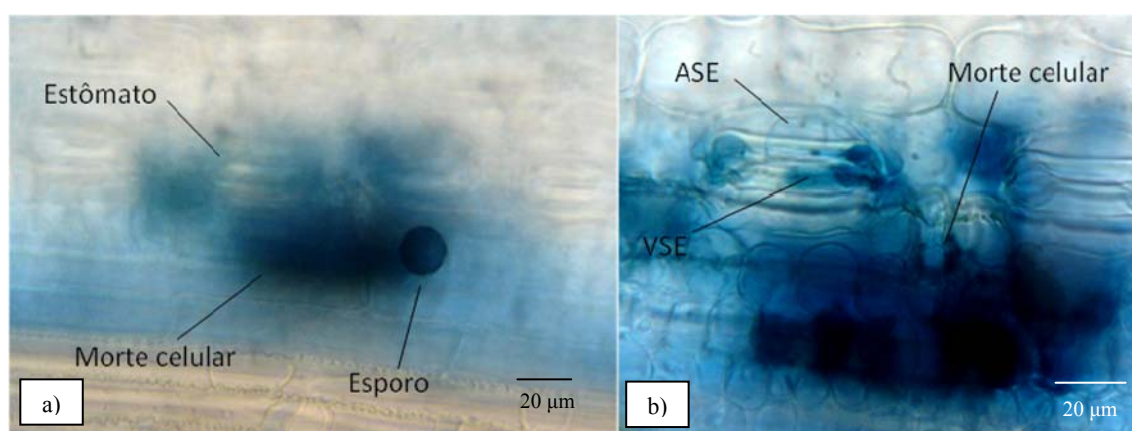


FIGURA 43. Morte celular em resposta à tentativa de colonização por *Puccinia triticina* no genótipo de trigo Toropi, na fase de planta adulta, 240 hai. a) Esporo com apressório sobre estômato (ASE), vesícula sub-estomatal (VSE) e morte celular em A= 200X e b) A= 400x. Porto Alegre, RS. 2011.

## b) Formação de papilas na parede celular do hospedeiro

### b.a) Plântulas

O único genótipo a formar papila nos locais de contato da CMH de *P. triticina* com a parede celular da célula hospedeira foi URS 22 (aveia) ( $P=0,0004$ ) (Figura 44). Em 48 hai, houve formação de papilas em 16,7% das células hospedeiras em contato com CMHs enquanto que em 120 hai esta proporção aumentou para 75% (Figura 45).

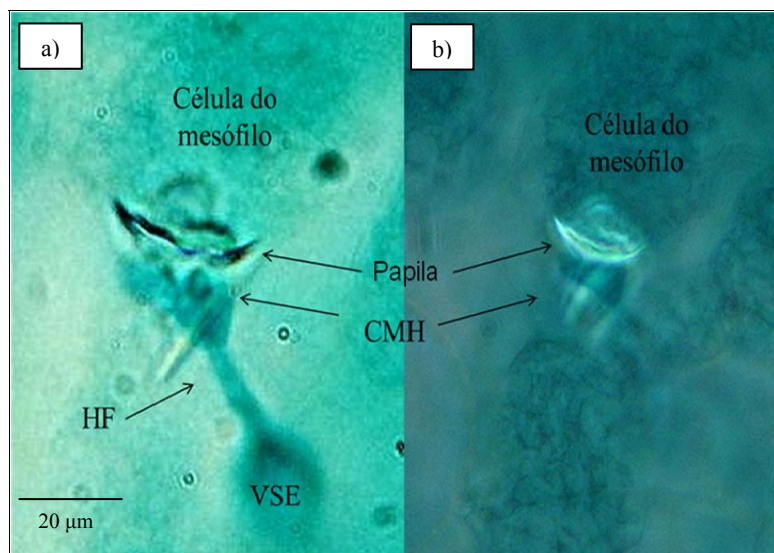


FIGURA 44. Formação de papila em célula do mesófilo do genótipo de aveia URS 22 em resposta à tentativa de penetração por *Puccinia triticina*, na fase de plântula. a) Sem contraste de fases e b) com contraste de fases, 120 hai, A= 1000x. Porto Alegre, RS. 2011.

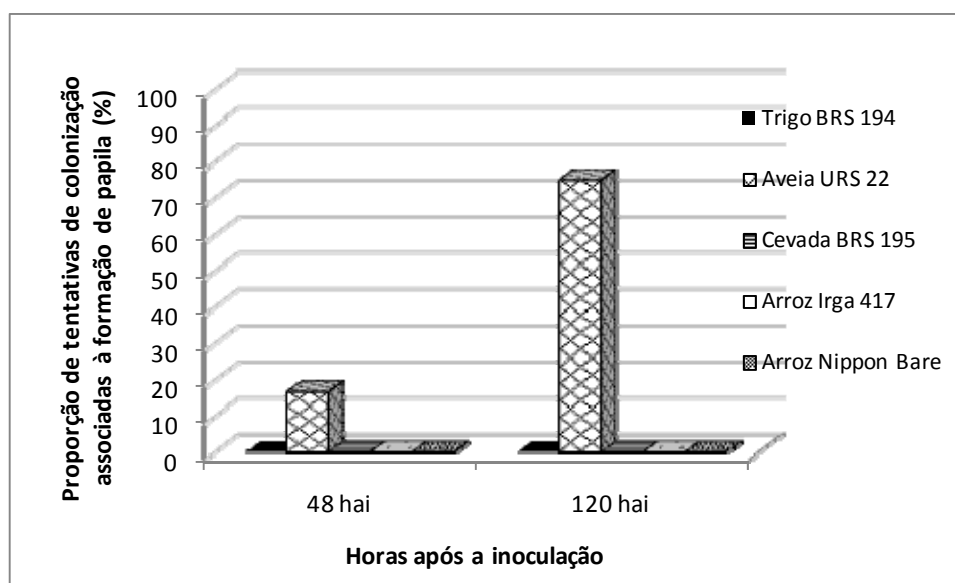


FIGURA 45. Proporção de tentativas de colonização de *Puccinia triticina* associadas com a formação de papilas, em 48 e 120 hai, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.

### b.b) Planta adulta

Nos genótipos testados na fase de planta adulta, não se observou a formação de papilas.

### 5.3 Histolocalização de compostos autofluorescentes

Nas análises para a presença de compostos autofluorescentes nas células hospedeiras em resposta às tentativas de infecção por *P. triticina* foram consideradas duas situações. A primeira, relacionando a presença de autofluorescência com o total de ASEs. Em uma segunda situação, se considerou a presença de autofluorescência, relacionando-a com pelo menos a formação de VSEs. Esta diferenciação foi feita porque nem todos os ASEs deram origem a VSEs e a fluorescência poderia ocorrer somente quando a VSE fosse formada. Quando houve a formação de VSE foi considerado que houve sucesso na penetração.

Os esporos depositados sobre as folhas e os apressórios foram levemente fluorescentes.

#### a) Plântulas

Quando foi considerada a formação de ASEs em 48 hai, houve diferença na proporção de células autofluorescentes associadas à tentativas de penetração. Porém, esta não ultrapassou 42% ( $P=0,0093$ ). No entanto, considerando-se pelo menos a formação de VSEs, esta proporção aumentou em todos os genótipos não-hospedeiros, variando de 60-100% ( $P<0,0001$ ). Isto leva a crer que a penetração na câmara sub-estomatal, caracterizada pela formação de VSE, foi o fator principal a desencadear a produção destes compostos (Figura 46).

No genótipo hospedeiro (BRS 194) a proporção de células com autofluorescência não diferiu ao considerar as diferentes estruturas. Mesmo em células com formação de haustórios não houve produção expressiva de compostos autofluorescentes. Na maioria dos locais onde houve autofluorescência, esta foi fraca e somente o estômato apresentava fluorescência.

Em aveia (URS 22) houve um expressivo aumento da proporção quando foi considerada a formação de VSEs, porém, a autofluorescência foi fraca e mais localizada nos estômatos. No genótipo de cevada (BRS 195) 60% das tentativas de colonização com formação de VSEs estiveram associadas à produção de compostos autofluorescentes (Tabela 16). Neste genótipo, a fluorescência foi bem marcada, com diversas células autofluorescentes.

Nos genótipos de arroz Irga 417 e Nippon Bare houve a produção de compostos autofluorescentes em 72 e 100%, respectivamente, dos locais com formação de VSEs. Esta fluorescência concentrou-se logo abaixo dos estômatos penetrados, ao redor da VSE.

Em 120 hai houve maior produção de compostos autofluorescentes em comparação com 48 hai. Neste horário, praticamente todas as penetrações estiveram associadas com alguma fluorescência de células, até mesmo no genótipo hospedeiro BRS 194 ( $P=0,0758$ ). No entanto, em BRS 194 apenas o estômato apresentou fluorescência.

Dentre os genótipos não-hospedeiros, a aveia foi a que apresentou a fluorescência mais fraca. Esta esteve presente em todos os estômatos penetrados, porém, foi restrita ao estômato e algumas vezes, à VSE. Em cevada e arroz, além da alta associação de estômatos penetrados com fluorescência, esta foi forte e geralmente envolveu mais de uma célula. As células do mesófilo de arroz são menores em relação aos outros cereais, por isso, em termos de área, a autofluorescência das mesmas foi mais restrita. O genótipo não-hospedeiro com maior produção de compostos autofluorescentes em resposta à infecção por *P. triticina* foi cevada (Figura 47). Neste, quando os segmentos foram observados em microscopia de luz, mesmo sem nenhum corante, era possível visualizar o amarelecimento das células. Quando observadas em

luz epifluorescente, estas se mostravam altamente fluorescentes.

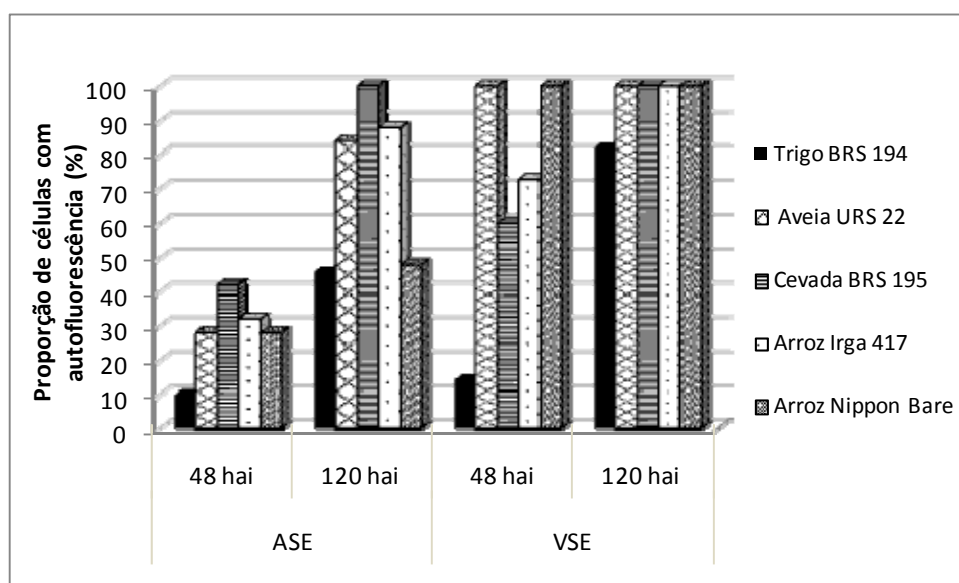


FIGURA 46. Proporção de células com autofluorescência associadas à tentativas de penetração e colonização de *Puccinia triticina*, em 48 e 120 hai, em diferentes espécies de Poaceae, na fase de plântula. ASE= apressório sobre estômato, VSE= vesícula sub-estomatal. Porto Alegre, RS. 2011.

TABELA 16. Ocorrência de autofluorescência em resposta à tentativa de infecção por *Puccinia triticina* em diferentes espécies de Poaceae, 48 e 120 hai, na fase de plântula. ASE= apressório sobre estômato, VSE= vesícula sub-estomatal. Porto Alegre, RS. 2011.

Genótipo	Fluorescência			
	ASE		VSE	
	48 hai	120 hai	48 hai	120 hai
<b>BRS 194 (trigo)</b>	10 b*	46 b	14,28 b	82,14 a
<b>URS 22 (aveia)</b>	28 ab	84 a	100 a	100 a
<b>BRS 195 (cevada)</b>	42 a	100 a	60 a	100 a
<b>Irga 417 (arroz)</b>	32 ab	88 a	72,72 a	100 a
<b>Nippon Bare (arroz)</b>	28 ab	48 b	100 a	100 a
	<b>CV= 24,82%</b>		<b>CV= 24,48%</b>	

\*Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%.

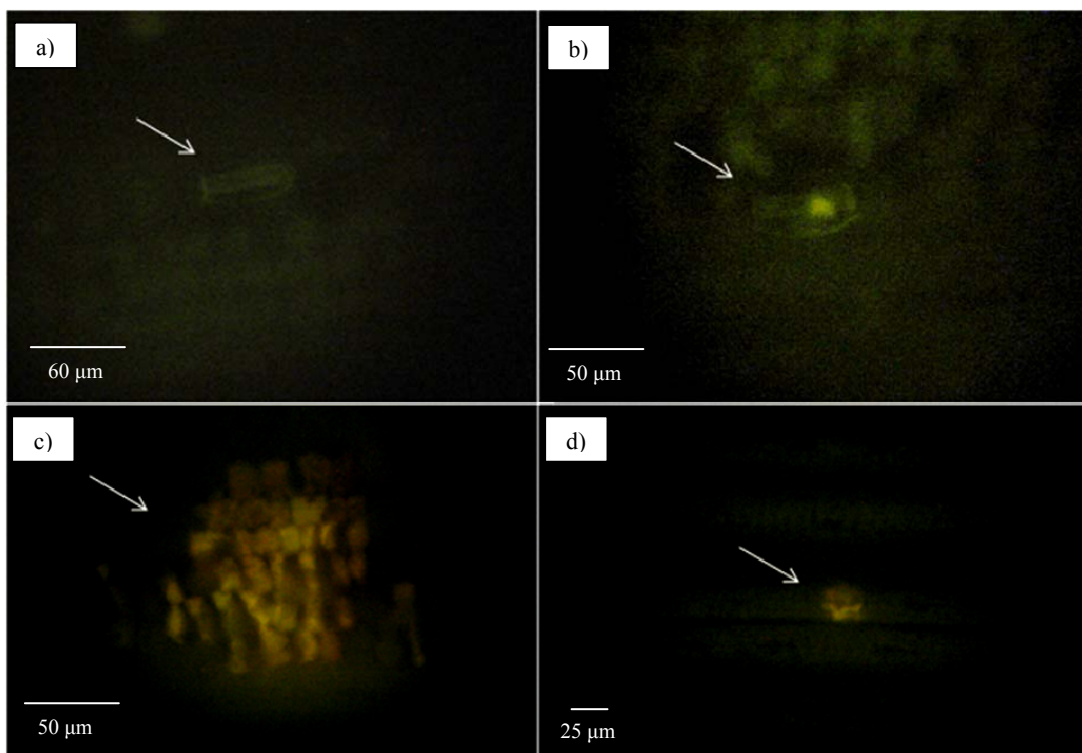


FIGURA 47. Produção de compostos autofluorescentes por diferentes espécies de Poaceae, em resposta à tentativa de infecção por *Puccinia triticina*, 120 hai, na fase de plântula. a) Trigo BRS 194, A= 400x, b) Aveia URS 22, A= 400x, c) Cevada BRS 195, A= 200x e d) Arroz Irga 417, A= 200x. Setas indicam a autofluorescência. Porto Alegre, RS. 2011.

### b) Planta adulta

Na fase de planta adulta, 36 hai, houve a associação de células autofluorescentes em 41% das tentativas de infecção por *P. triticina* em *Lr9* e 27% em Toropi. Em BRS 194 não foram observadas células autofluorescentes. Estes resultados permitiram separar os genótipos em três grupos distintos ( $P < 0,0001$ ).

Em 48 hai, considerando-se a formação de ASEs, apenas os genótipos de trigo Toropi e *Lr9* apresentaram células autofluorescentes (Tabela 17). Em 120 hai, BRS 194 e BRS 195 apresentaram uma baixa proporção de células autofluorescentes associadas às tentativas de penetração. Esta foi fraca e restrita ao estômato onde se formou o apressório, não ultrapassando 4% das tentativas avaliadas. Nos genótipos de arroz não foi observada autofluorescência de células ( $P < 0,0001$ ).



Ao analisar a formação de VSEs (considerando que a penetração tenha ocorrido com sucesso nestes casos) verificou-se um aumento na proporção de células autofluorescentes associadas a tentativas de colonização (Figura 48). Em 48 hai, nos genótipos Toropi e *Lr9* esta proporção foi de 89 e 100%, respectivamente. Em 120 hai, BRS 194 apresentou leve fluorescência em 11% dos estômatos penetrados, enquanto que em Toropi e *Lr9* a taxa de células autofluorescentes associadas foi de 100% ( $P < 0,0001$ ). Em ambos os genótipos a fluorescência foi bem marcada, com várias células apresentando a produção de compostos autofluorescentes (Figura 49).

Em cevada, apesar da alta proporção em 120 hai, a taxa de formação de VSEs foi baixa, nos poucos locais onde ocorreu a formação desta estrutura, houve uma leve fluorescência do estômato penetrado. Nos genótipos de arroz não se verificou a formação de VSEs, tampouco autofluorescência.

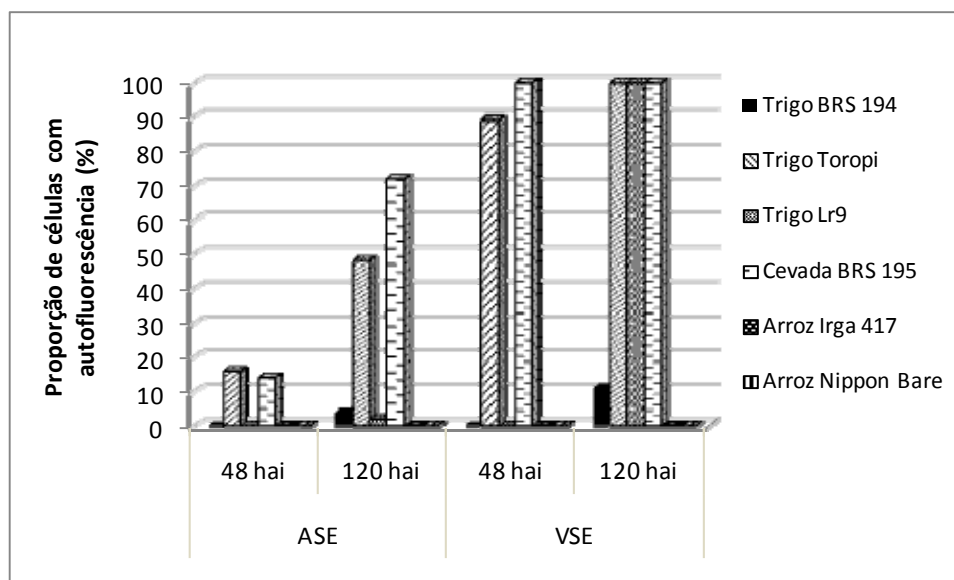


FIGURA 48. Proporção de células com autofluorescência associadas a tentativas de penetração e colonização de *Puccinia triticina*, em 48 e 120 hai, em diferentes espécies de Poaceae, na fase de planta adulta. ASE= apressório sobre estômato, VSE= vesícula sub-estomatal. Porto Alegre, RS. 2011.



TABELA 17. Ocorrência de autofluorescência em resposta à tentativa de infecção por *Puccinia triticina* em diferentes espécies de Poaceae, 48 e 120 hai, na fase de planta adulta. ASE= apressório sobre estômato, VSE= vesícula sub-estomatal. Porto Alegre, RS. 2011.

Genótipo	Fluorescência			
	ASE		VSE	
	48 hai	120 hai	48 hai	120 hai
<b>BRS 194 (trigo)</b>	0 b*	4 c	0 b	11,11 b
<b>Toropi (trigo)</b>	16 a	48 b	88,88 a	100 a
<b>Lr9 (trigo)</b>	14 a	72 a	100 a	100 a
<b>BRS 195 (cevada)</b>	0 b	2 c	0 b	100 a
<b>Irga 417 (arroz)</b>	0 b	0 c	0 b	0 b
<b>Nippon Bare (arroz)</b>	0 b	0 c	0 b	0 b
	<b>CV= 14,50%</b>		<b>CV= 16,45%</b>	

\*Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%.

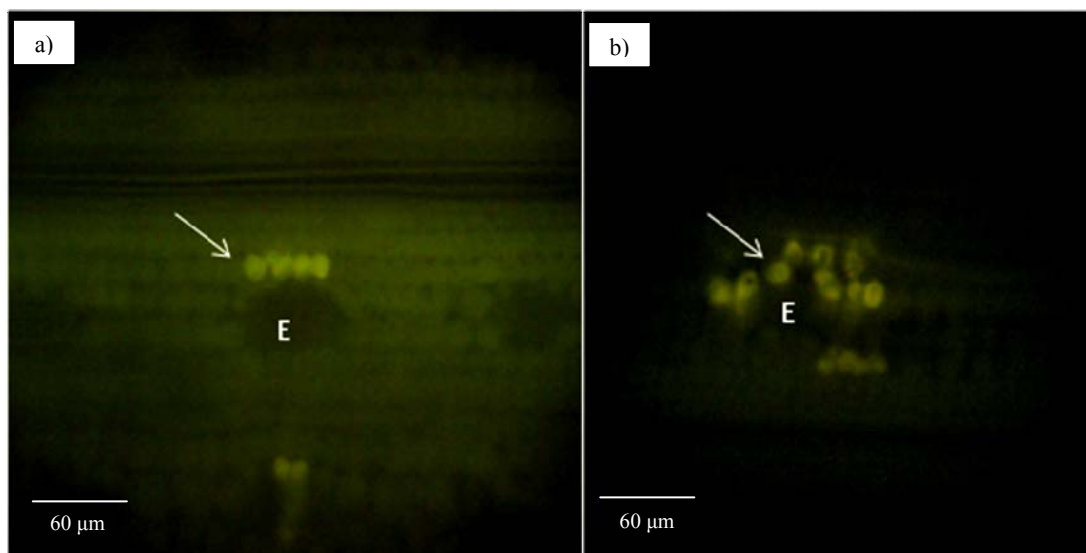


FIGURA 49. Produção de compostos autofluorescentes por genótipos de trigo, em resposta à tentativa de infecção por *Puccinia triticina*, 120 hai, na fase de planta adulta. a) Toropi, A= 400x, b) Lr9, A= 400x Setas indicam a autofluorescência. E= estômato. Porto Alegre, RS. 2011.

#### 5.4 Histolocalização de espécies reativas de oxigênio (ROS)

As amostras que reagiram positivamente com o corante DAB para o acúmulo de espécies reativas de oxigênio apresentaram uma coloração marrom abaixo dos estômatos penetrados por *P. triticina*.

##### a) Plântulas

De certa forma, todos os genótipos reagiram produzindo alguma quantidade de

ROS ( $H_2O_2$ ). No entanto, esta produção variou temporal e quantitativamente entre os distintos genótipos ( $P < 0,0001$ ) (Tabela 16). De modo geral, os genótipos não-hospedeiros de *P. triticina*, com exceção de URS 22 (aveia), foram os que apresentaram a maior proporção de tentativas de penetração associadas à produção de ROS (Figura 50).

O genótipo hospedeiro, BRS 194 apresentou uma proporção sempre inferior à 36%, exceto em 96 hai, onde 55% das tentativas de penetração estiveram associadas à produção de ROS. Neste genótipo, houve pouca produção de ROS. Nos casos onde houve a reação com DAB, esta foi fraca e localizada sobre o estômato. Em locais onde a infecção foi paralisada, estendeu-se para a VSE.

Em URS 22 a proporção de reações positivas com DAB variou de 7-33%, sendo que os picos de produção foram em 72 e 120 hai. A reação neste genótipo foi mais marcada que a reação de BRS 194, mas também restrita ao estômato e algumas vezes, ao apressório formado.

No genótipo de cevada BRS 195, a proporção de reação com DAB foi superior a 40% em todos os horários testados. Os horários com maior produção de ROS foram 48 e 72 hai, sendo que a reação foi bem marcada em todos os horários testados, aumentando o número de células envolvidas (tamanho) no decorrer do tempo.

Nos genótipos de arroz, Irga 417 e Nippon Bare, a proporção de reação com DAB foi superior a 60% em todos os horários testados. Nestes, a reação foi mais marcada do que em URS 22 e BRS 194. No entanto, mais restrita que a reação de BRS 195 (Figura 51).

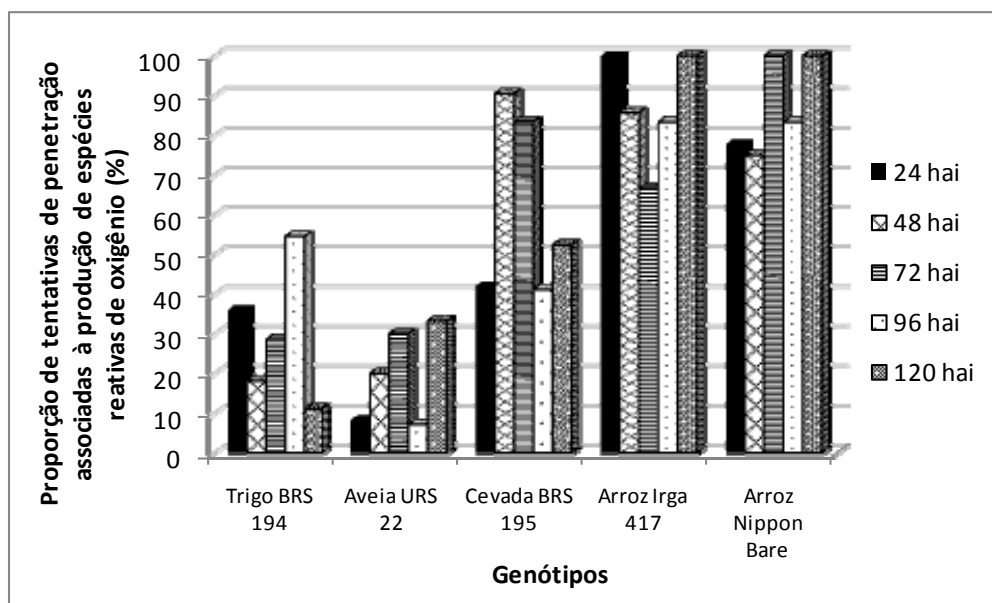


FIGURA 50. Proporção de tentativas de penetração de *Puccinia triticina* associadas com a produção de espécies reativas de oxigênio, em diferentes espécies de Poaceae e horas após a inoculação, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.

TABELA 18. Produção de espécies reativas de oxigênio em resposta à tentativa de infecção por *Puccinia triticina* em diferentes espécies de Poaceae e horas após a inoculação, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.

Horário	Genótipo				
	BRS 194 (trigo)	URS 22 (aveia)	BRS 195 (cevada)	Irga 417 (arroz)	Nippon Bare (arroz)
24 hai	36 ab*	8,33 b	42,1 ab	100 a	77,77 ab
48 hai	18,18 b	20 b	90,47 a	85,71 a	75 ab
72 hai	28,57 b	30 b	83,33 a	66,66 ab	100 a
96 hai	54,54 ab	7,14 b	41,17 b	83,33 a	83,33 a
120 hai	11,11 b	33,33 b	52,38 b	100 a	100 a
Médias	29,68	19,76	61,89	87,14	87,22
CV= 18%					

\*Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%.

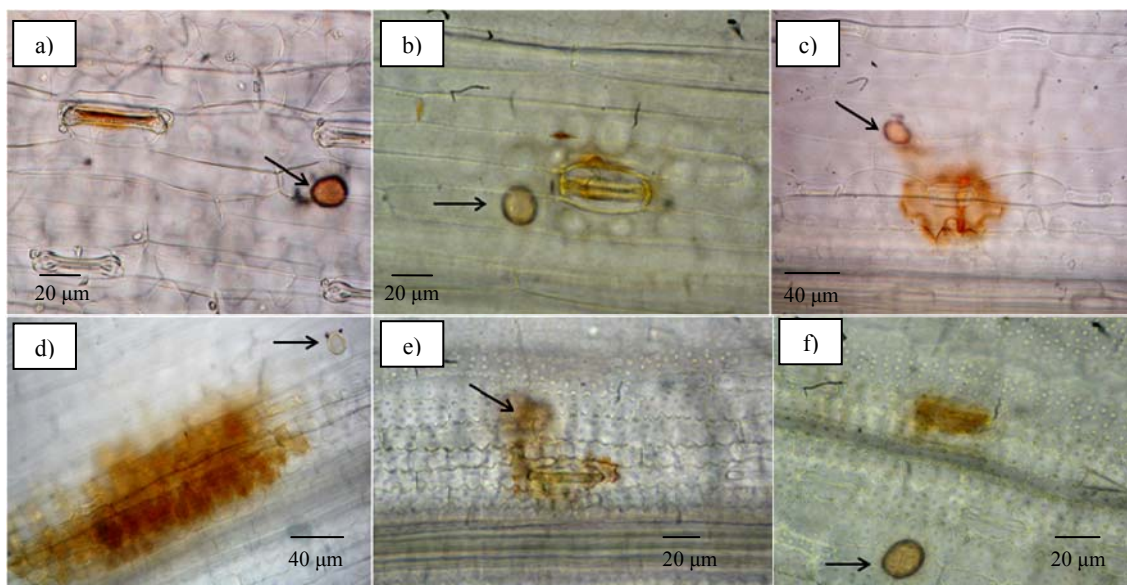


FIGURA 51. Produção de espécies reativas de oxigênio por diferentes espécies de Poaceae em resposta à tentativa de infecção por *Puccinia triticina*, na fase de plântula. a) Trigo BRS 194, 120 hai, A= 400x, b) Aveia URS 22, 120 hai, A= 400x, c) Cevada BRS 195, 24 hai, A= 200x, d) Cevada BRS 195, 120 hai, A= 200x, e) Arroz Irga 417, 120 hai, A= 400x e f) Arroz Nippon Bare, 120 hai, A= 400x. Setas indicam o esporo. Porto Alegre, RS. 2011.

### b) Planta adulta

Na fase de planta adulta foram testados apenas os genótipos de trigo BRS 194, Toropi e *Lr9* e o genótipo de cevada BRS 195. Os demais genótipos não foram testados em razão de problemas apresentados na câmara climatizada, fazendo com que os mesmos fossem perdidos.

A produção de ROS variou temporal e quantitativamente entre os genótipos ( $P < 0,0001$ ) (Tabela 17). O genótipo BRS 194, suscetível à *P. triticina*, apresentou produção de ROS em menos de 23% das tentativas de penetração observadas (Figura 52). Quando houve reação com DAB, esta foi fraca e localizada sobre os estômatos. Em Toropi, genótipo com resistência parcial, menos de 2% das tentativas de penetração reagiram com DAB. A formação de ASEs não induziu a produção de ROS.

No genótipo com resistência qualitativa *Lr9*, nenhuma reação foi observada em 24 hai. Porém, 48 hai, 38% das tentativas de penetração reagiram com DAB. Após este

horário a proporção reduziu para cerca de 5% das tentativas observadas.

O genótipo de cevada BRS 195 reagiu com DAB em todos os horários testados, exceto 24 hai. Esta proporção aumentou no decorrer do tempo, variando de 30%, em 48 hai, até 80%, em 120 hai. Neste genótipo a reação geralmente foi bem marcada e não restrita ao estômato (Figura 53).

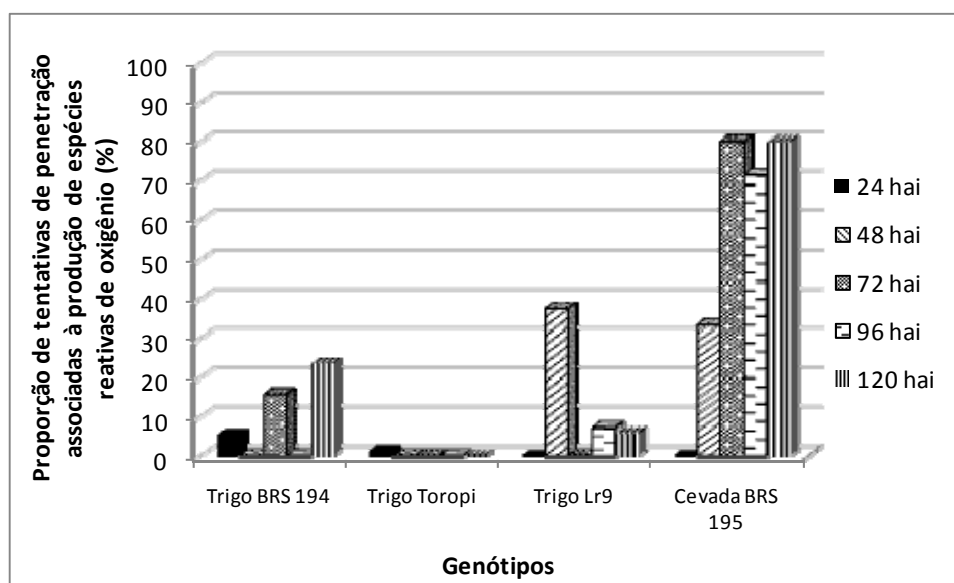


FIGURA 52. Proporção de tentativas de penetração de *Puccinia triticina* associadas com a produção de espécies reativas de oxigênio, em diferentes espécies de Poaceae e horas após a inoculação, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.

TABELA 19. Produção de espécies reativas de oxigênio em resposta à tentativa de infecção por *Puccinia triticina* em diferentes espécies de Poaceae e horas após a inoculação, na fase de planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.

Horário	Genótipo			
	BRS 194 (trigo)	Toropi (trigo)	Lr9 (trigo)	BRS 195 (cevada)
24 hai	5,55 a*	1,31 a	0 a	0 a
48 hai	0 b	0 b	37,5 a	33,33 a
72 hai	15,71 b	0 c	0 c	80 a
96 hai	0 b	0 b	7,14 b	71,42 a
120 hai	23,52 b	0 b	5,88 b	80 a
<b>Médias</b>	8,96	0,26	10,10	52,95
<b>CV= 13,4%</b>				

\*Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%.

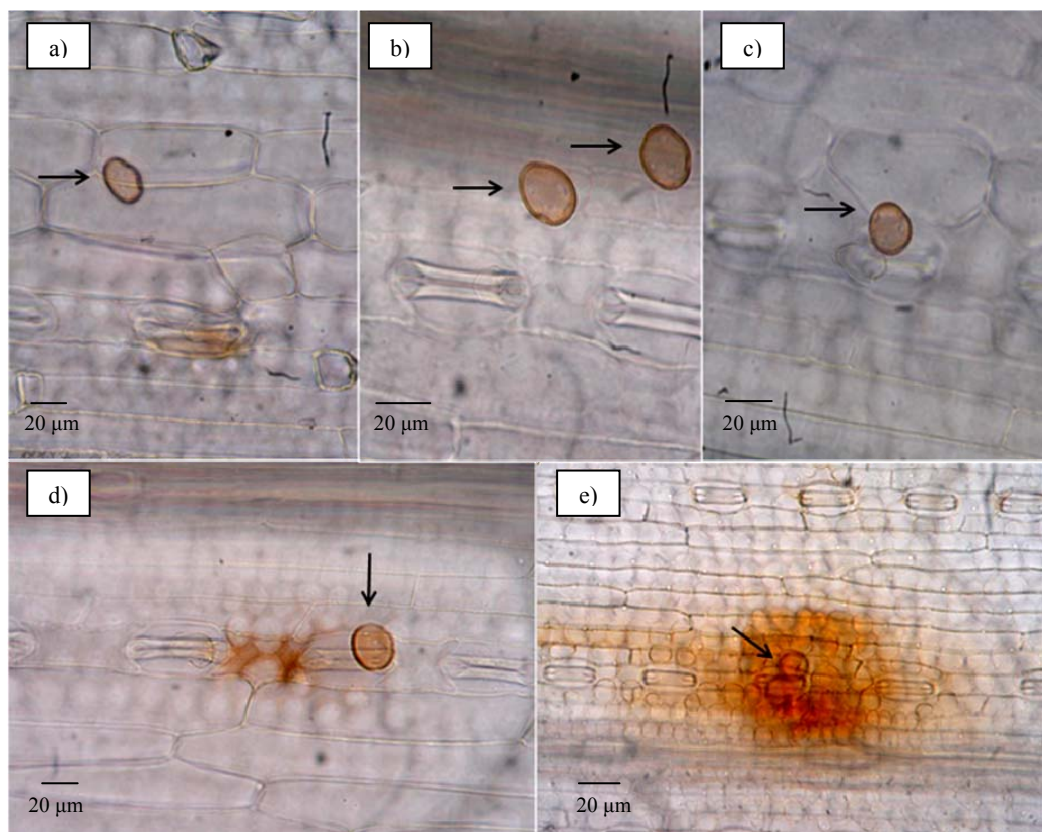


FIGURA 53. Produção de espécies reativas de oxigênio por diferentes espécies de Poaceae em resposta à tentativa de infecção por *Puccinia triticina*, na fase de planta adulta. a) Trigo BRS 194, 120 hai, A= 400x, b) Trigo Toropi, 120 hai, A= 400x, c) Trigo Toropi 120 hai, A= 400x, d) Trigo *Lr9*, 120 hai, A= 400x, e) Cevada BRS 195,120 hai, A= 200x. Setas indicam o esporo. Porto Alegre, RS. 2011.

Os coeficientes de correlação entre as variáveis estudadas na fase de plântula e planta adulta, nos horários de 48 e 120 hai, são apresentados nas tabelas de 23-26 (Apêndice). Em plântulas, 48 hai, não houve forte correlação entre nenhuma das variáveis testadas (Tabela 23). No entanto, em 120 hai a proporção de tecido esporogênico e de colônias foi correlacionada positivamente ( $\rho = 0,94$ ), bem como, a proporção de tentativas de infecção com pelo menos formação de VSEs apresentando células autofluorescentes e a produção ROS ( $\rho = 0,72$ ). A presença de tecido esporogênico correlacionou-se negativamente com a presença de células autofluorescentes em resposta a formação de ASEs ( $\rho = -0,62$ ), com a presença de células autofluorescentes em resposta a formação de VSEs ( $\rho = -1$ ), com a produção de

ROS ( $\rho = -0,35$ ), com ocorrência de morte celular ( $\rho = -0,23$ ) e com a formação de papilas ( $\rho = -0,24$ ). Resultados similares foram observados para as correlações envolvendo a presença de colônias estabelecidas e respostas de resistência (Tabela 25).

Em planta adulta, 48 hai, houve alta correlação entre a autofluorescência de células em resposta à formação de ASEs e VSEs ( $\rho = 0,99$ ). Ainda, houve correlação positiva entre a presença de células autofluorescentes em resposta a formação de VSEs e morte celular ( $\rho = 0,69$ ) (Tabela 24).

Em 120 hai houve correlação positiva entre produção de tecido esporogênico e presença de colônias ( $\rho = 0,85$ ) e presença de células autofluorescentes em resposta a formação de ASEs e morte celular ( $\rho = 0,96$ ). A formação de colônias correlacionou-se negativamente com a presença de células autofluorescentes em resposta a formação de ASEs ( $\rho = -0,21$ ), com a presença de células autofluorescentes em resposta a formação de VSEs ( $\rho = -0,32$ ), com a produção de ROS ( $\rho = -0,16$ ) e com a ocorrência de morte celular ( $\rho = -0,25$ ). Resultados similares foram observados para as correlações envolvendo a presença de tecido esporogênico e as respostas de resistência (Tabela 26).

Uma síntese dos resultados de histopatologia e das reações de resistência é apresentada na Tabela 20.

TABELA 20. Sumarização dos eventos infectivos e reações de resistência em resposta a inoculação por *Puccinia triticina* em diferentes espécies de Poaceae, nas fases de plântula e planta adulta. Porto Alegre, RS. 2011.

Eventos infectivos e reações de resistência	Plântulas										Planta adulta											
	Trigo BRS 194		Cevada BRS 195		Aveia URS 22		Arroz Irga 417		Arroz Nippon Bare		Trigo BRS 194		Trigo <i>Lr9</i>		Trigo Toropi		Cevada BRS 195		Arroz Irga 417		Arroz Nippon Bare	
	48 hai	120 hai	48 hai	120 hai	48 hai	120 hai	48 hai	120 hai	48 hai	120 hai	48 hai	120 hai	48 hai	120 hai	48 hai	120 hai	48 hai	120 hai	48 hai	120 hai	48 hai	120 hai
Germinação	+++	+++	+++	+++	++++	+++	+++	++	+++	+++	++++	++++	++++	+++	++++	+++	++++	+++	++++	+++	++++	+++
Formação de apressório sobre estômato	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++	++	+	+++	++++	++++	++++	++	+++	+	+++	+	+++	-	-
Formação de vesícula sub-estomatal	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++	++++	-	++++	+++	+++	++++	+++	+++	++++	-	-	-	-	-
Formação de hifa infectiva	++++	++++	+++	++++	++++	++++	-	-	-	-	+++	++++	++++	++++	++	-	-	-	-	-	-	-
Formação de célula-mãe-de-haustório	++++	++++	++	++++	+++	++++	-	-	-	-	++++	+++	++++	++++	-	-	-	-	-	-	-	-
Formação de haustório	++++	++++	++	++	-	-	-	-	-	-	++++	++++	++++	++++	-	-	-	-	-	-	-	-
Presença de morte celular	-	-	++	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	++++	-	+++	-	-	-	-	-	-
Presença de papila	-	-	-	-	++	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Presença de ROS	++	++	++++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	-	+++	+++	++	-	-	+++	++++	/	/	/	/
Presença de compostos autofluorescentes	+	++	+++	++++	++	+++	+++	++++	+++	++++	+	+	++++	++++	+++	++++	-	+++	-	-	-	-

Os sinais de + conferem noção de intensidade. O sinal de - significa ausência de produção e a barra (/) indica que o genótipo não foi avaliado para esta característica. Desta forma, ++++ é indicativo de alta produção.



### 5.5 Análises histopatológicas em microscopia espectral confocal

A microscopia confocal permite a obtenção de imagens tridimensionais das estruturas fúngicas formadas no interior dos tecidos da planta. Estas análises possibilitaram visualizar com clareza a diferenciação dos distintos eventos infectivos envolvidos nas tentativas de infecção por *P. triticina* em cada espécie de Poaceae.

Nos genótipos de arroz (Irga 417 e Nippon Bare) a infecção é paralisada logo após a formação de VSEs. Em 48 hai há uma evidente diferenciação nas estruturas fúngicas formadas entre o genótipo de aveia (URS 22) e o genótipo suscetível BRS 194.

Em aveia a infecção é paralisada logo após a formação de CMHs, enquanto que em trigo, no mesmo horário, já são formadas tanto HFs como CMHs (Figura 54).

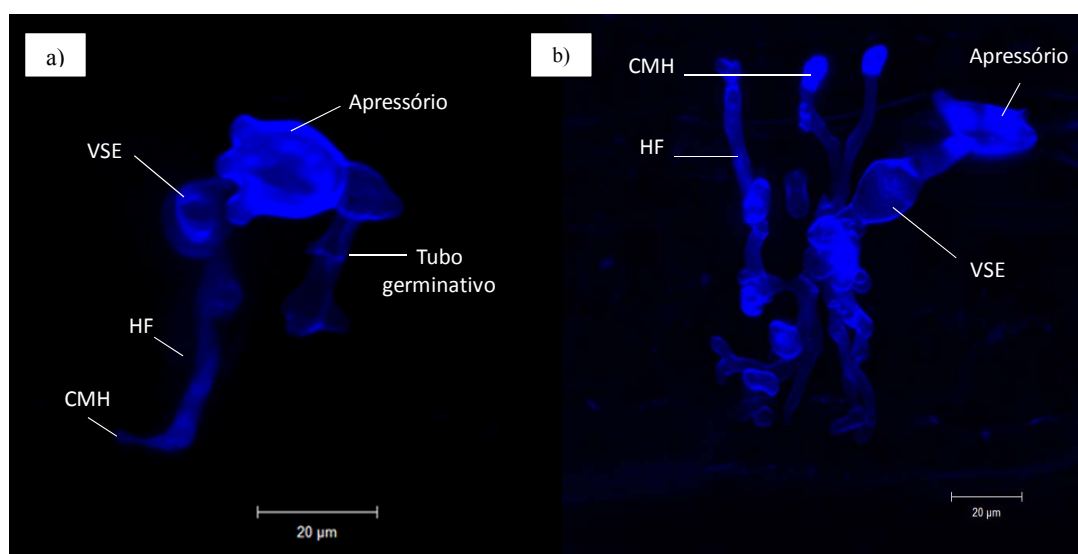


FIGURA 54. Estruturas infectivas de *Puccinia triticina* em microscopia confocal. a) apressório, vesícula sub-estomatal (VSE), hifa infectiva (HF) e célula mãe-de-haustório (CMH) em aveia URS 22, 120 hai, A= 40x; b) apressório, vesícula sub-estomatal, hifas infectivas e células mãe-de-haustórios em trigo BRS 194, 48 hai, A= 20x. Porto Alegre, RS. 2011.

Em cevada (BRS 195) foi observada a diferenciação de estruturas até a formação de HFs. Associado a este crescimento fúngico, notou-se a formação de compostos autofluorescentes nos locais de penetração (Figura 55). Este resultado é semelhante ao

que foi observado nas análises para presença de células autofluorescentes em microscopia óptica de epifluorescência (ítem 5.3).

Às 120 hai, BRS 194 apresentou intensa colonização dos tecidos por hifas intercelulares, com formação de diversos haustórios. Houve ainda, a formação de tecido esporogênico (Figuras 56 e 57).

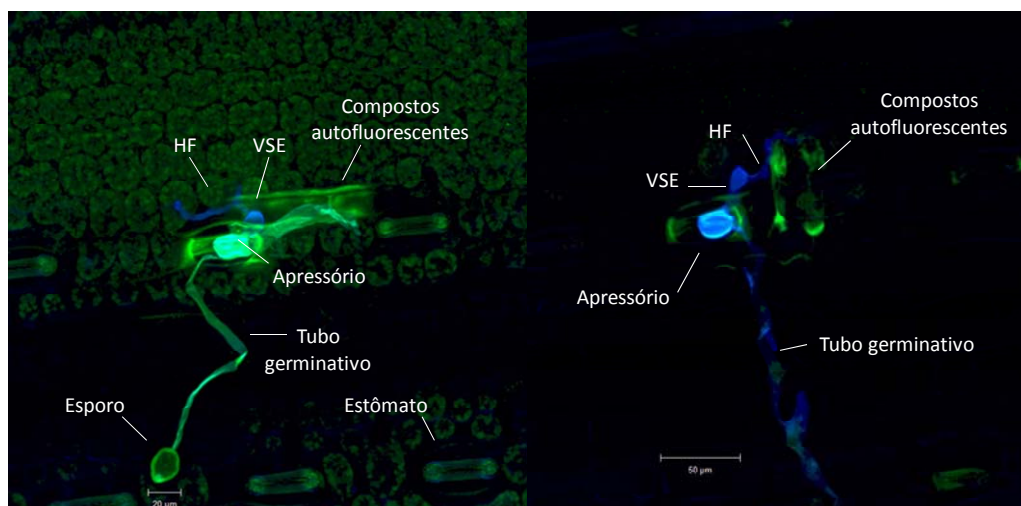


FIGURA 55. Estruturas infectivas de *Puccinia triticina* e produção de compostos autofluorescentes no genótipo de cevada BRS 195, em microscopia confocal. Apressório, vesícula sub-estomatal (VSE), hifa infectiva (HF), 48 hai, A= 20x. Porto Alegre, RS. 2011.

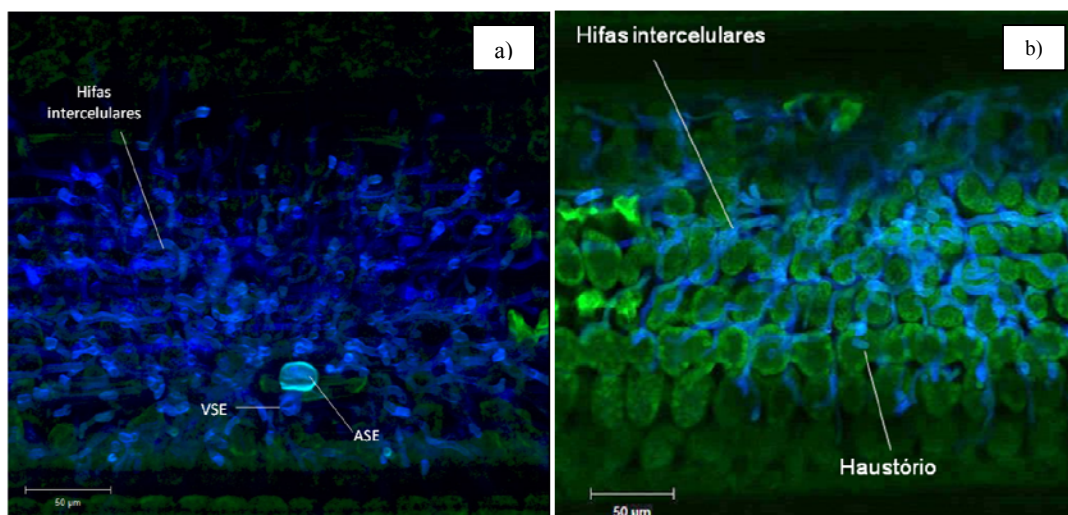


FIGURA 56. Estruturas infectivas de *Puccinia triticina* no interior dos tecidos do genótipo de trigo BRS 194, em microscopia confocal. a) apressório sobre estômato (ASE), vesícula sub-estomatal (VSE) e intenso crescimento de hifas intercelulares; b) Hifas intercelulares e haustórios, 120 hai, A= 20x. Porto Alegre, RS. 2011.

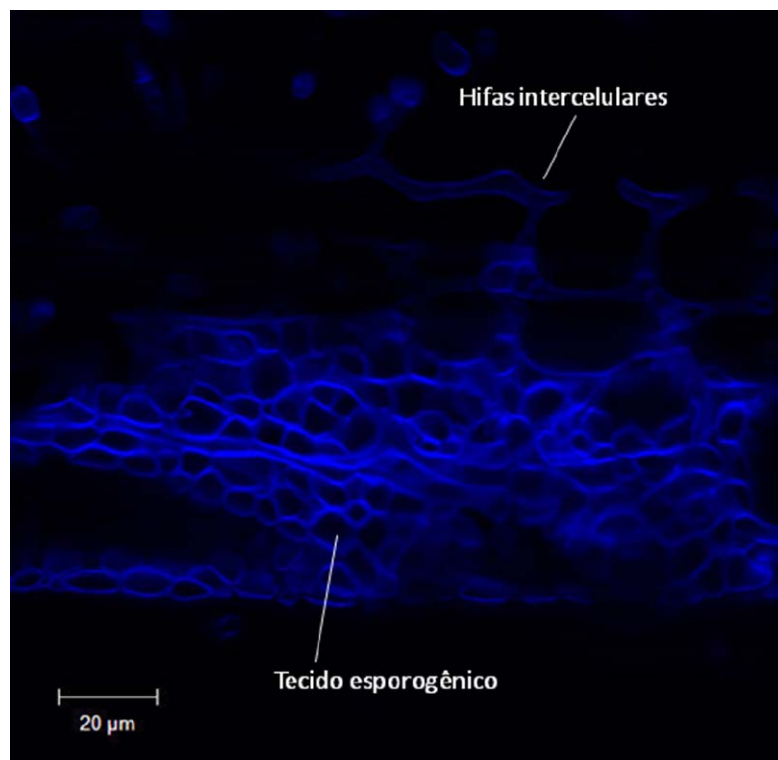


FIGURA 57. Hifas intercelulares e tecido esporogênico de *Puccinia triticina* no interior dos tecidos do genótipo BRS 194, em microscopia confocal, 120 hai, A= 40x. Porto Alegre, RS. 2011.

## 5.6 Exame macroscópico

### a) Planta adulta

O exame macroscópico da reação dos genótipos foi efetuado 15 dias após a inoculação. Em planta adulta as avaliações foram realizadas em folha bandeira e as reações fenotípicas variaram de suscetibilidade até resistência (Tabela 21).

Dentre os genótipos hospedeiros, BRS 194 apresentou tipo de infecção suscetível à *P. triticina*, com formação de pústulas grandes, geralmente não associadas à clorose e distribuídas uniformemente por toda a lâmina foliar. Em Toropi as pústulas foram de suscetibilidade, com raros sinais de clorose. O genótipo *Lr9* apresentou tipo de infecção resistente, sem pústulas e com raros pontos cloróticos de hipersensibilidade (Figura 58).

Há uma clara diferenciação na severidade de ferrugem da folha entre Toropi e

BRS 194 (Figura 59). Esta redução certamente está atrelada à menor permissividade de Toropi ao fungo, explícita nas análises histológicas apresentadas neste trabalho.

Nos genótipos não-hospedeiros (cevada e arroz) a reação foi de resistência do tipo 1, ou seja, sem sinais visíveis de infecção pelo patógeno (Figura 60).

TABELA 21. Tipo de infecção<sup>a</sup> em genótipos hospedeiros e não-hospedeiros, na fase de planta adulta, resultante de inoculações com *Puccinia triticina*. Porto Alegre, RS. 2011.

Genótipo	Tipo de infecção	Fenótipo
BRS 194	3 4	Suscetível
Toropi	3	Suscetível (RPA)
<i>Lr9</i>	0 ;	Resistente
BRS 195	0	Resistente (tipo 1)
Irga 417	0	Resistente (tipo 1)
Nippon Bare	0	Resistente (tipo 1)

<sup>a</sup>Tipo de infecção segundo Roelfs *et al.*, 1992 e Oh *et al.*, 2006.



FIGURA 58. Reação fenotípica de distintos genótipos de trigo em resposta à inoculação com *Puccinia triticina*, na fase de planta adulta, 15 dias após a inoculação. a) BRS 194, b) Toropi e c) *Lr9*. Porto Alegre, RS. 2011.





FIGURA 59. Comparação da severidade apresentada por distintos genótipos de trigo em resposta à inoculação com *Puccinia triticina*, na fase de planta adulta, 15 dias após a inoculação. a) Toropi e b) BRS 194. Porto Alegre, RS. 2011.



FIGURA 60. Reação fenotípica de resistência de não-hospedeiro do tipo 1 em resposta à inoculação com *Puccinia triticina* nos genótipos de cevada a) BRS 195 e de arroz b) Irga 417 e c) Nippon Bare, na fase de planta adulta, 15 dias após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2011.

### b) Plântulas

Na fase de plântula, o genótipo de trigo BRS 194 foi o único a apresentar reação fenotípica de suscetibilidade à *P. triticina* (Figura 61). Todas as outras espécies de Poaceae testadas apresentaram reação de resistência, pois são consideradas não-hospedeiras para a ferrugem da folha do trigo (Tabela 22). No entanto, a reação de

resistência em não-hospedeiros diferiu fenotipicamente entre os diferentes cereais (Figura 62).

O genótipo de aveia, URS 22 e os genótipos de arroz Irga 417 e Nippon Bare apresentaram resistência de não-hospedeiro do tipo 1, sem a manifestação de sinais visíveis do patógeno. Porém, o genótipo de cevada BRS 195 apresentou resistência de não hospedeiro do tipo 2, com pontos cloróticos característicos de hipersensibilidade e algumas pústulas de resistência, localizadas principalmente na ponta das folhas (Figura 63).

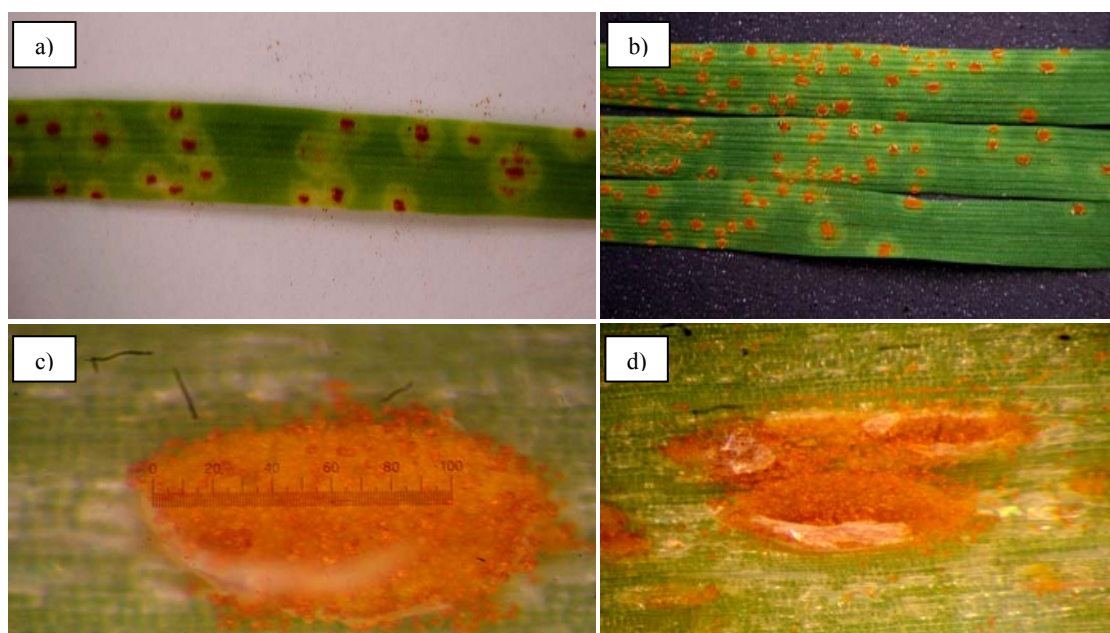


FIGURA 61. Reação de suscetibilidade em resposta à inoculação com *Puccinia triticina* no genótipo de trigo BRS 194, na fase de plântula, 15 dias após a inoculação. a) Pústulas de suscetibilidade; b) Pústulas com tipo de infecção 3 c) Pústula que rompeu a epiderme, expondo esporos, vista sob microscópio estereoscópio. A= 6,3x; d) Pústulas coalescidas. A= 6,3x. Porto Alegre, RS. 2011.

TABELA 22. Tipo de infecção<sup>a</sup> em distintos genótipos, resultante de inoculações com *Puccinia triticina*, na fase de plântula. Porto Alegre, RS. 2011.

Genótipo	Tipo de infecção	Fenótipo
BRS 194	4	Suscetível
BRS 195	0 ; 1 2	Resistente (tipo 2)
URS 22	0	Resistente (tipo 1)
Irga 417	0	Resistente (tipo 1)
Nippon Bare	0	Resistente (tipo 1)

<sup>a</sup>Tipo de infecção segundo Roelfs *et al.*, 1992 e Oh *et al.*, 2006.



FIGURA 62. Reação fenotípica à inoculação com *Puccinia triticina* nos genótipos de trigo a) BRS 194, de cevada b) BRS 195, de aveia c) URS 22 e de arroz d) Irga 417 e e) Nippon Bare, na fase de plântula, 15 dias após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2011.

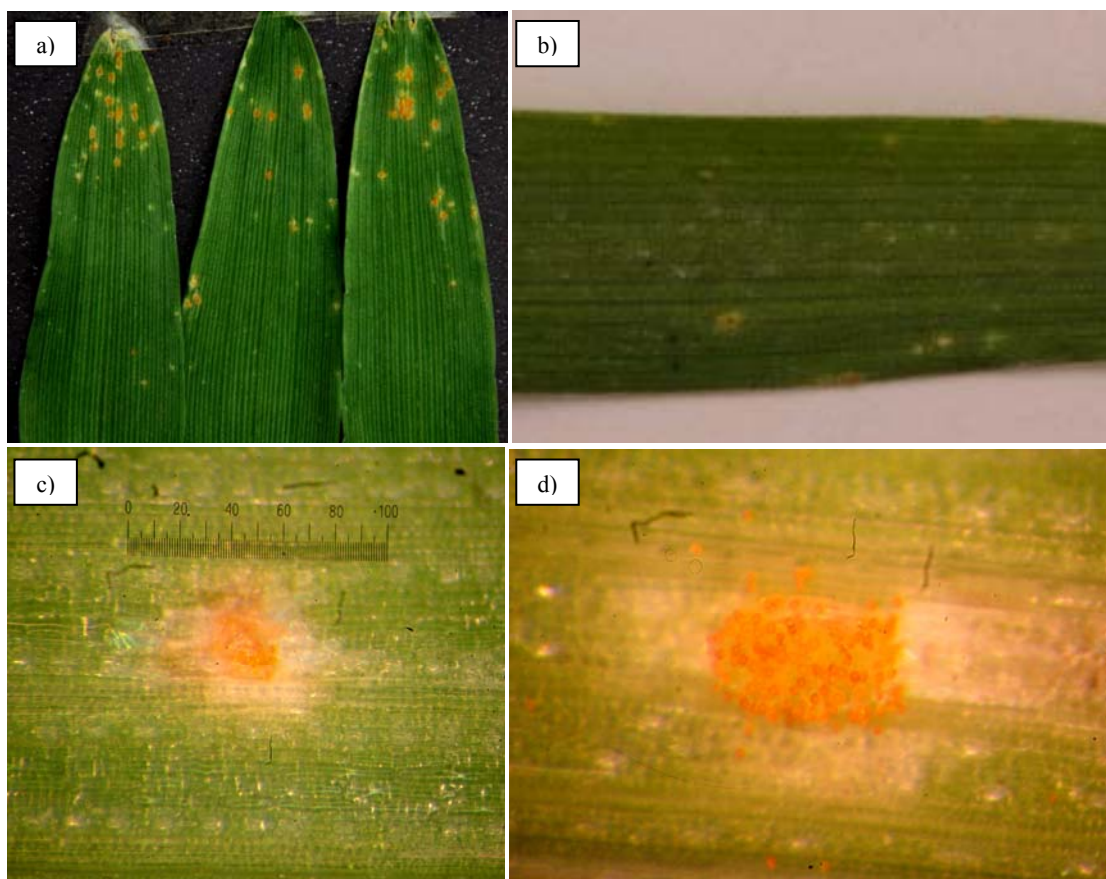


FIGURA 63. Reação de resistência de não-hospedeiro do tipo 2 em resposta à inoculação com *Puccinia triticina* no genótipo de cevada BRS 195, na fase de plântula, 15 dias após a inoculação. a) Pústulas de resistência na ponta da folha; b) Pústulas com tipo de infecção 1 e 2; c) Pústula recoberta pela epiderme, vista sob microscópio estereoscópio. A= 6,3x; d) Pústula de tamanho diminuto com borda clorótica. A= 8x. Porto Alegre, RS. 2011.



## 6 DISCUSSÃO

Embora as plantas estejam constantemente expostas aos mais diversos tipos de microrganismos, estas possuem resistência à maioria dos patógenos. Isto porque desenvolveram eficientes sistemas de detecção e de resposta a infecções por microrganismos. A informação genética que cada planta possui é determinante para sua reação frente à patógenos potenciais e muitas vezes, depende da percepção de determinadas moléculas para que seja induzida. A habilidade de detectar organismos potencialmente patogênicos e desencadear respostas de defesa foi essencial para o sucesso e evolução das plantas.

O que torna possível que um patógeno infecte uma ou mais espécies de plantas também é sua característica genética. Para que a infecção ocorra com sucesso o patógeno necessita de um ou mais genes de patogenicidade, de especificidade e de virulência ao hospedeiro em questão. Estes genes geralmente são específicos para uma ou algumas espécies de plantas. Esta especificidade explica por que alguns patógenos são capazes de se desenvolver em determinada espécie e incapazes de se desenvolver em outras. A resistência que a planta possui a maioria de patógenos potenciais é conhecida como resistência de não-hospedeiro (Agrios, 2005; Göhre & Robatzek, 2008; Manickavelu *et al.*, 2010).

Em espécies cultivadas, além dos genes inerentes da espécie, muitos genes são introduzidos através de melhoramento genético. Estes genes geralmente protegem a planta de todas as raças do patógeno e atuam pela exclusão das raças que não possuem

genes de virulência específicos ao gene de resistência. No entanto, este tipo de resistência acaba por ser efetivo durante pouco tempo, pois é comum o surgimento de raças possuidoras do gene de virulência capaz de infectar as plantas com o gene de resistência. Muitas vezes o gene de virulência já está presente na população patogênica, porém, em baixa frequência. Em outros casos, pode surgir por mutação ou recombinação. A exclusão das raças que não possuem o referido gene de virulência acaba por permitir que os poucos indivíduos que possuem o gene de virulência se multipliquem sem competição, levando assim, à erosão da resistência (Agrios, 2005; Bent & Mackey, 2007; Kliebenstein & Rowe, 2009; Manickavelu *et al.*, 2010).

Desta forma, a resistência parcial é uma alternativa promissora na busca de formas de resistência mais duráveis (Poland *et al.*, 2008), visto que não restringe o desenvolvimento do patógeno, além de geralmente envolver a ação de vários genes de pequeno efeito, que combinados, resultam na resistência. Assim, para que esta resistência seja erodida, são necessárias inúmeras mutações no patógeno (Jagger *et al.*, 2011; Huerta-Espino *et al.*, 2011).

A durabilidade da resistência está estreitamente relacionada com a adaptabilidade do patógeno. Caso a mutação necessária para a virulência afete características essenciais para a sobrevivência do patógeno, é pouco provável que ocorra. Então, quanto maior o custo que a mutação (ou mutações) ocasionar sobre a adaptabilidade do patógeno, mais durável será a resistência (McDonald and Linde 2002; Agrios, 2005).

Provavelmente a resistência quantitativa afete componentes críticos para o sucesso do patógeno e por isto, os genes que os codificam são menos propensos à evolução do que os genes envolvidos nas interações gene a gene. Alternativamente, os genes quantitativos podem fornecer uma resistência menos restritiva à adaptabilidade do

patógeno. Em ambos os cenários, há uma redução na pressão seletiva para que os patógenos evoluam, fazendo com que a durabilidade da resistência nestes casos, seja maior (Kliebenstein & Rowe, 2009).

A planta pode apresentar defesas estruturais ou químicas, pré-existentes ou induzidas. Estas defesas estruturais pré-existentes podem incluir a quantidade de pêlos ou ceras na epiderme da planta, o tempo de abertura dos estômatos, entre outros. As defesas químicas incluem exsudatos da folha e a presença de inibidores nas células, como compostos fenólicos, taninos, etc. Pode ocorrer ainda, a ausência de reconhecimento químico entre a planta e o patógeno. Nestes casos, a planta pode perder receptores de sua superfície (polissacarídeos, oligossacarídeos) e desta forma, o patógeno não a reconhece como hospedeiro. Ainda, a planta pode ser reconhecida como hospedeira, mas não possuir substâncias essenciais para o desenvolvimento do patógeno (Agrios, 2005; Göhre & Robatzek, 2008; Manickavelu *et al.*, 2010).

As defesas induzidas dependem do reconhecimento do patógeno como tal, através de moléculas sinalizadoras (elicitores – toxinas, glicoproteínas, peptídeos). Após o reconhecimento, há a ativação de uma cascata de transdução de sinais que envolve a fosforilação de proteínas, fluxo de íons, produção de ROS, entre outros. Estes sinalizadores primários ativam genes de defesa que possuem como produtos as peroxidases, proteínas de parede celular, inibidores de proteínas, enzimas hidrolíticas, proteínas relacionadas à patogênese (PR) e fitoalexinas. Esta ativação resulta nas respostas de defesa estruturais (formação de papila, lignificação, etc) e bioquímicas disponíveis (morte celular por hipersensibilidade, acúmulo de fitoalexinas) (Chisholm *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006; Bent & Mackey, 2007; Göhre & Robatzek, 2008; Manickavelu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010).

No caso da resistência de não-hospedeiro envolvendo espécies não relacionadas, é comum que o reconhecimento de moléculas não específicas do patógeno (os PAMPs – componentes da parede celular do fungo, por exemplo) ative respostas de defesa estruturais ou bioquímicas (Bent & Mackey, 2007; Göhre & Robatzek, 2008). Quando as espécies são relacionadas, como é o caso deste trabalho, que testa diferentes espécies de Poaceae e sua reação à *P. triticina*, a resistência de não-hospedeiro envolve principalmente o reconhecimento de moléculas específicas do patógeno. Assim, a resistência de não-hospedeiro pode ocorrer de forma similar à interação gene-a-gene, culminando na indução de diferentes mecanismos de defesa, estruturais ou químicos.

Nos casos onde a distância taxonômica entre as plantas é pequena, acredita-se que a resistência de não-hospedeiro, em conjunto com as resistências parcial e qualitativa, formem barreiras contínuas e múltiplas de defesa (Agrios, 2005).

A ferrugem da folha do trigo, causada por *P. triticina* é a mais comum e amplamente distribuída doença deste cereal. A família Poaceae engloba alguns dos mais importantes cereais cultivados, tanto em termos de nutrição humana como animal. Apesar disto, o conhecimento a respeito dos mecanismos de resistência atuantes nestes cereais e de como o crescimento do patógeno é restringido, ainda é limitado (Huerta-Espino *et al.*, 2011; Bischof *et al.*, 2011).

Com base no exposto, a proposta deste trabalho foi quantificar os eventos infectivos envolvidos nas interações envolvendo *P. triticina* x Poaceae, identificando possíveis mecanismos de resistência em hospedeiros com resistência parcial e qualitativa e em não-hospedeiros.

De acordo com estudos preliminares realizados em hospedeiros e não-hospedeiros, a germinação de esporos tem início por volta de 3 hai (dados não apresentados). A formação de ASEs ocorre após 6 horas da inoculação e a de VSEs por

volta de 12 hai. As demais estruturas são diferenciadas a partir de 18 hai. Estudos do desenvolvimento de *P. striiformis* em trigo, realizados por Yu *et al.* (2010), relatam a formação das primeiras HFs e CMHs já em 12 hai e os primeiros haustórios 18 hai. Desta forma, a diferenciação de estruturas infectivas de *P. triticina* parece ocorrer mais tarde quando comparada com as estruturas formadas por *P. striiformis* em trigo.

A metodologia de clarificação e coloração de amostras utilizada em horários mais avançados da infecção (item 4.5.1.3.1) foi a que melhor possibilitou a visualização de estruturas do patógeno no interior dos tecidos da planta. A visualização de estruturas fúngicas foi mais clara em tecidos de plântulas do que em plantas adultas, independente do genótipo e da espécie. Liu & Harder (1996) relatam a dificuldade de se observar o crescimento de *P. graminis* f. sp. *tritici* em plantas adultas de cevada, visto que o tecido adulto possui uma conformação irregular de células e as paredes celulares são mais espessas.

Para otimização das avaliações histopatológicas, propõe-se a escolha de horários mais avançados do processo infectivo, posteriores a 24 hai. Acredita-se que o tempo de 48 hai seja suficiente para evidenciar reações de resistência como morte celular, acúmulo de compostos autofluorescentes e peróxido de hidrogênio. Avaliações anteriores a 48 hai podem subestimar reações de resistência. Além disto, neste horário também é possível avaliar os eventos pré-haustorias de resistência, que ocorrem nas fases iniciais do processo infectivo.

A escolha de uma única técnica para seleção de genótipos com resistência parcial não é tão simples, visto que cada uma delas tem objetivos distintos. As análises em microscopia de epifluorescência, embora sejam relativamente mais fáceis, em termos metodológicos de preparo das amostras, não diferenciam os genótipos com resistência pré e pós-haustorial. Tanto Toropi quanto *Lr9* apresentaram células

autofluorescentes associadas às tentativas de infecção (Figura 49). A mesma dificuldade é observada nas análises com DAB (para formação de  $H_2O_2$ ), onde o genótipo com resistência parcial (Toropi) não possui reação positiva (Figura 53). A coloração com *Trypan blue*, além de propiciar a quantificação das estruturas fúngicas, permite a identificação de morte celular. Por isso, pode ser a mais indicada, quando o intuito for analisar diversos genótipos em um curto espaço de tempo. Neste caso, pode-se verificar a ocorrência de mecanismos de resistência pré-haustoriais (via redução na formação de estruturas fúngicas como ASEs, VSEs, HFs e CMHs) e pós-haustoriais (morte celular).

Caso haja interesse em se investigar que respostas da planta são responsáveis pela resistência pré e/ou pós-haustorial observadas, aí sim, podem ser realizados outros testes histoquímicos, como avaliação da presença de compostos autofluorescentes, peróxido de hidrogênio, entre outros.

A avaliação dos processos infectivos iniciais de *P. triticina* na fase de planta adulta demonstrou que as proporções de esporos germinados e de apressórios formados sobre os estômatos foram semelhantes no genótipo de trigo com resistência parcial (Toropi) e no genótipo suscetível (BRS 194). Esta semelhança se explica, visto que o crescimento dos tubos germinativos em direção ao estômato e a formação de apressórios são induzidos pelas características físicas e químicas da folha, bem como, pela topografia das células guarda (Rubiales & Niks, 1992a). Ambos os genótipos pertencem à mesma espécie e provavelmente, não possuem grandes diferenças na superfície foliar que possam reduzir a germinação ou impedir a localização de estômatos. Jacobs (1989a) relata que nas interações envolvendo trigo e *P. triticina*, diferenças na germinação de esporos e formação de apressórios não são relacionadas com a presença de genes de resistência.

A diferença entre estes genótipos manifestou-se de forma significativa entre o período de pré-penetração e penetração, após a formação de ASEs, corroborando ao que é relatado por Sillero & Rubiales (2002), onde genótipos de *V. fabae* com diferentes níveis de resistência à *U. viciae-fabae* apresentaram diferenças mais expressivas somente após a penetração do fungo na câmara sub-estomatal.

Na fase de penetração, Toropi apresentou uma redução na proporção de VSEs diferenciadas e de todos os eventos infectivos subsequentes à formação desta estrutura, quando comparado com BRS 194 (Figuras 8, 10 e 12). Jacobs (1990), ao estudar o desenvolvimento de *P. triticina* em genótipos suscetíveis e com resistência parcial, relatou que nos genótipos com resistência parcial, grande parte das VSEs não diferenciou HFs. Estas VSEs foram consideradas abortadas. Quando ocorreu a formação de HFs, apenas uma ou duas CMHs foram formadas. Na mesma interação, em genótipos com resistência parcial, Qamar *et al.* (2009) verificaram alta proporção de VSEs abortadas, sem o envolvimento de morte celular.

A redução dos eventos infectivos nas fases iniciais da interação de *P. triticina* x Toropi indica o envolvimento de mecanismos pré-haustoriais de resistência, comuns em genótipos possuidores de resistência parcial (Niks, 1989; Niks & Dekens, 1991; Rubiales & Moral, 2004). Estes, possivelmente, são induzidos após a percepção do patógeno na superfície foliar ou então, no momento da formação dos apressórios.

A diferenciação verificada na fase inicial do processo infeccioso entre Toropi e o genótipo suscetível BRS 194 corrobora ao que é relatado por Silva (2006). De acordo com o autor, a sinalização para a resistência de Toropi parece ocorrer tão logo o esporo se fixe na epiderme. Uma hora após a inoculação foram identificadas sequências candidatas a sinalizadoras primárias e secundárias da presença do patógeno, além de mensageiros secundários envolvidos na ativação de proteínas PR. A partir daí, há uma

alteração no metabolismo basal e produção de precursores para o metabolismo secundário, além da rápida indução de rotas envolvidas na síntese de substâncias antimicrobianas.

Na interação incompatível entre *P. striiformis* e o genótipo de trigo Suwon 11 (resistência total) os genes de resistência reconhecem rapidamente os efetores do patógeno, induzindo genes relacionados à transdução de sinais antes de 12 hai, coincidindo com a formação de HFs e CMHs deste fungo. Às 18 hai há um aumento nos genes envolvidos em respostas de defesa, resultando no acúmulo de ROS e transportadores ABC, período no qual se inicia a formação de haustórios. A maioria dos genes relacionados à defesa tem sua expressão máxima 24 hai, coincidindo com a presença de haustórios em quase todas as tentativas de infecção e com o início da RH (Yu *et al.*, 2010).

Se no caso de resistência pós-haustorial (RH) a sinalização para a defesa ocorre em um período anterior às 12 hai, a sinalização para defesa em genótipos com resistência parcial, como Toropi, deve ocorrer nas fases iniciais de contato entre patógeno e hospedeiro. Esta rápida sinalização estaria refletindo-se na menor proporção de estruturas fúngicas formadas e na reduzida eficiência de infecção em Toropi, quando comparado com BRS 194.

Estudos da diferenciação na expressão gênica em interações compatíveis e incompatíveis entre patógenos e hospedeiros têm revelado que a expressão de genes de defesa nas plantas resistentes ocorre de forma mais rápida e intensa do que em plantas suscetíveis. Esta diferenciação pode estar relacionada aos primeiros genes ativados após o contato do patógeno com o hospedeiro, induzindo diferenças nas respostas e no tempo das mesmas (Li *et al.*, 2006; Rampitsch *et al.*, 2006; Manickavelu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Bischof *et al.*; 2011). Bozkurt *et al.* (2010) compararam os transcritos



envolvidos nas respostas de resistência à *P. striiformis* f. sp. *tritici* mediados pelos genes *Yr1* e *Yr5* (específicos à raças) e *Yr39* (de planta adulta, não específico à raças), verificando que há baixa frequência de transcritos comuns entre estes genes. Os transcritos comuns restringiram-se aos genes de proteínas PR e genes clássicos relacionados à defesa, evidenciando que as plantas possuem uma variedade de rotas para se defender de patógenos. Nas plantas com resistência parcial, conferida pelos genes *Lr34* e *Yr39*, parece haver a indução de respostas mais amplas do que nos casos de resistência raça-específica. Esta maior amplitude de respostas de defesa pode ser a causa da durabilidade da resistência quantitativa (Bolton *et al.*, 2008; Coram *et al.*, 2008).

Além dos eventos infectivos iniciais (6, 12 e 18 hai), foram avaliados os eventos infectivos intermediários e finais (48, 120 e 240 hai) da infecção por *P. triticina* em diferentes genótipos, hospedeiros ou não.

A taxa de germinação de esporos na fase de plântula foi similar entre os genótipos BRS 194 (trigo), BRS 195 (cevada) e URS 22 (aveia). No entanto, nos genótipos de arroz Irga 417 e Nippon Bare, esta foi reduzida (Tabela 2). O mesmo foi observado em plantas adultas, onde os genótipos de arroz apresentaram as menores taxas de germinação de esporos (Tabela 8). A menor germinação em arroz contrasta com afirmações de que esporos de ferrugens germinam igualmente bem em hospedeiros e não-hospedeiros (Heath, 1981; Niks & Rubiales, 2002).

Acredita-se que a redução na germinação de esporos nos genótipos de arroz deve-se à morfologia das folhas. Sob microscopia, percebe-se que a estrutura foliar, a disposição e a forma dos estômatos diferem do padrão apresentado pelos outros genótipos. Além disto, as folhas de arroz são mais coriáceas e podem apresentar diferenças no espaçamento entre células da epiderme. Estas características podem

resultar em menor germinação de esporos ou, redução na aderência dos esporos germinados na epiderme. Esporos não germinados ou não fortemente aderidos à superfície podem ter sido removidos pela solução fixadora, corante ou clarificante utilizadas, superestimando assim, a proporção de esporos germinados. Em arroz a taxa de esporos germinados reduziu no decorrer do tempo, a estrutura foliar aliada à perda de viabilidade dos esporos/ e ou ausência de estímulos para germinação, podem ser responsáveis por esta menor germinação.

A germinação irregular ou reduzida pode ser resultado de inibição química, pobre umidade na folha ou abundância de pêlos. Outros mecanismos de resistência podem ocorrer após a germinação de esporos e antes da penetração no estômato, resultando em menor adesão à superfície das folhas (Vaz Patto & Rubiales, 2009).

A proporção de esporos germinados que deram origem a ASEs em plântulas foi similar entre BRS 194 e BRS 195, intermediária em URS 22 e reduzida nos genótipos de arroz (Tabela 3). Em planta adulta, a taxa de formação de ASEs foi maior em BRS 194 (suscetível) e *Lr9* (resistência específica à raças). Toropi (resistência parcial) apresentou taxa de formação de ASEs semelhante ao que foi observado nas espécies não-hospedeiras (Tabela 9).

Além da menor germinação observada nos genótipos de arroz, houve uma baixa formação de ASEs, principalmente na fase de planta adulta, onde as diferenças na morfologia da folha são mais expressivas. De acordo com Heath (1997), no caso de espécies não-hospedeiras com topografias da folha muito distintas da espécie hospedeira, é mais comum a ocorrência de falhas na localização dos estômatos.

Em não-hospedeiros, a menor formação de ASEs pode ser em razão de dois mecanismos de evitação: crescimento desorientado dos tubos germinativos, em razão da topografia da folha, impossibilitando a localização dos estômatos ou; os tubos

germinativos localizam os estômatos, mas não são induzidos a formar apressórios e penetrar, por isso, muitas vezes crescem sobre o estômato (Rubiales & Niks, 1992; Broers & López-Atilano, 1996).

Com relação à proporção de ASEs que diferenciaram VSEs em plântulas, BRS 194 e BRS 195 apresentaram taxas similares, seguidos de URS 22. Os genótipos de arroz, especialmente a variedade japônica Nippon Bare, apresentaram as menores taxas (Tabela 4). Nestes genótipos, algumas células abaixo dos locais com tentativa de penetração apresentaram um amarelecimento e muitas VSEs apresentaram aspecto deteriorado (Figura 17). O amarelecimento ou *browning* das células do mesófilo está relacionado com a ativação da resistência (Mares & Cousen, 1977; Wit, 1977), podendo ocorrer devido ao acúmulo de compostos fenólicos (Taylor & Mims, 1991).

Na fase de planta adulta, as maiores taxas de formação de VSEs foram observadas em *Lr9* e BRS 194. Nesta fase, não foram observadas VSEs em arroz (Tabela 10). Em BRS 195 foram observadas VSEs somente em 48 hai. A ausência de VSEs no genótipo de cevada, 120 hai, pode ser um indicativo de desintegração das mesmas, em razão da ativação de defesas da planta, como produção de fitoalexinas ou proteínas PR (glucanases) nos locais de infecção. Estas proteínas podem digerir a parede celular da VSE, que contém *B*-glucanos. Este colapso também é observado em genótipos de trigo com resistência durável à *P. striiformis* (Broers & López-Atilano, 1996). Estes autores relatam a redução no número de VSEs entre 48 e 144 hai. As VSEs observadas em BRS 195 apresentaram aspecto deteriorado em 48 hai, corroborando com esta possibilidade.

Em 48 hai, o genótipo de trigo Toropi apresentou cerca da metade do número de VSEs formadas em BRS 194. Em 120 hai, ambos os genótipos apresentaram taxas similares de formação de VSEs. O desenvolvimento de VSEs pode ser atrasado em

plantas com o gene de resistência de planta adulta *Yr18*, quando comparados com genótipo suscetível (Elahinia, 2008). Este atraso pode estar ocorrendo em Toropi, reduzindo o número de HFs formadas posteriormente.

Algumas vezes houve a formação de VSEs nas células da epiderme ou sobre os estômatos, tanto em plântulas como em planta adulta (dados não apresentados). Este fenômeno também foi relatado por Sillero & Rubiales (2002) em inoculações de *U. viciae-fabae* em fava.

Em plântulas, as maiores taxas de formação de HFs foram observadas em BRS 194, URS 22 e BRS 195. Em arroz, não foram observadas estas estruturas, indicando que a infecção é paralisada após a formação de VSEs (Tabela 5). Em planta adulta, as maiores taxas de formação de HFs ocorreram em BRS 194 e *Lr9*. Em Toropi houve uma baixa proporção de HFs formadas em 48 hai, sendo que em 120 hai nenhuma HF foi observada. Nos genótipos não-hospedeiros (cevada e arroz) não foram observadas HFs (Tabela 11).

O genótipo de cevada BRS 195 parece ser mais suscetível à infecção por *P. triticina* na fase de plântula do que na fase de planta adulta. Em plântulas houve uma taxa de formação de HFs similar à observada no genótipo suscetível BRS 194. Em planta adulta a infecção foi paralisada após a formação de VSEs.

Grande parte das HFs diferenciou CMHs em BRS 194, URS 22 e BRS 195, na fase de plântula. Em arroz não se observou a presença de CMHs. Da mesma forma, esta estrutura não foi observada na fase de planta adulta em Toropi (120 hai) e nos genótipos não-hospedeiros. Em BRS 194 e *Lr9* houve alta taxa de formação de CMHs nesta fase.

Em Toropi a infecção foi paralisada após a formação de HFs. Estas possivelmente também foram desintegradas por algum mecanismo de resistência, visto que foram observadas em 48, mas não em 120 hai.

A taxa de formação de CMHs em plântulas foi similar nos genótipos BRS 194, URS 22 e BRS 195. Em aveia, observou-se que em alguns pontos de contato da CMH com a célula do mesófilo da planta, ocorreu um amarelecimento. Este pode ser resultante do acúmulo de compostos de defesa nestes locais. Nos genótipos de arroz não foram observadas CMHs (Tabela 6). Em planta adulta, a maior taxa de formação de CMHs ocorreu em *Lr9*, seguido de BRS 194. Em Toropi e nos genótipos não-hospedeiros esta estrutura não foi observada (Tabela 12).

Uma alta proporção de CMHs diferenciou haustórios em BRS 194, na fase de plântula. Em BRS 195 alguns haustórios foram formados, porém, em frequência inferior a 10%. Nos demais genótipos não houve formação de haustórios. De acordo com este resultado, pode-se inferir que a infecção em URS 22 e nos genótipos de arroz, é paralisada antes da formação de haustórios, ou seja, por mecanismos pré-haustoriais de resistência (Tabela 7). Em BRS 195, a infecção é paralisada entre a formação de CMHs e haustórios, visto que alguns haustórios são formados (Figura 23). Neste caso, as CMHs podem não ser funcionais ou, devido à produção de compostos de defesa, terem as chances de infecção e diferenciação de haustórios reduzidas (Sillero & Rubiales, 2002).

A proporção de CMHs que diferenciaram haustórios em planta adulta foi elevada em BRS 194 e *Lr9*. Em Toropi e nos genótipos não-hospedeiros estas estruturas não foram observadas (Tabela 13 e Figura 36).

Em plântulas, 120 hai, no genótipo BRS 194, 90% dos haustórios formados estiveram associados à presença de colônias estabelecidas, caracterizadas pelo intenso crescimento de hifas intercelulares. Além disto houve a formação de tecido esporogênico em 18% destas colônias (Figura 22). Em planta adulta a formação de tecido esporogênico só foi observada em 240 hai, nos genótipos BRS 194 e Toropi (Figura

34). Ao estudar a interação de fava x *U. viciae-fabae*, Sillero & Rubiales (2002) relatam que a formação de tecido esporogênico ocorre antes em plântulas (6 dias após a inoculação) do que em plantas adultas. Provavelmente, a formação de tecido esporogênico é atrasada em plantas adultas, ocorrendo em um momento entre 120 hai (5 dias após a inoculação) e 240 hai (10 dias após a inoculação). Este atraso pode ocorrer em razão da estrutura da folha em planta adulta, bem mais rígida e menos permissiva do que em plântulas.

O genótipo de trigo *Lr9* não apresentou formação de colônias, tampouco de tecido esporogênico. Da mesma forma, nenhum dos genótipos não-hospedeiros diferenciou estas estruturas no interior de seus tecidos. *Lr9* possui resistência específica à raça. Este tipo de resistência é associado a RH e ativado após a formação de haustórios (Heath, 1997; Montesanto *et al.*, 2003). Até o momento de formação de haustórios, *Lr9* comportou-se como um genótipo suscetível. As respostas de defesa atuantes neste genótipo manifestam-se através de mecanismos pós-haustoriais de resistência. Orczyka *et al.* (2010) verificaram que a presença de genes *Lr* não afeta os processos iniciais do desenvolvimento fúngico, especialmente a germinação e formação de apressórios.

De acordo com os resultados observados no genótipo com resistência parcial Toropi, há uma redução sequencial na formação das estruturas infectivas, no decorrer do tempo (Figura 37). Esta redução já é percebida na proporção de ASEs, especialmente nos horários intermediários e finais do processo infeccioso. Broers & López-Atilano (1996) estudaram o mecanismo quantitativo de resistência à *P. striiformis* em trigo e relatam que a resistência atua sobre várias fases do desenvolvimento do fungo. O maior efeito da resistência foi na redução da formação de ASEs, resultando em cerca de 50%

menos ASEs formados, em comparação com o genótipo suscetível. Foram reduzidos ainda, o número de VSEs, HFs e CMHs.

Geralmente, a quantidade de esporos de ferrugem da folha presentes no início do ciclo da cultura do trigo é alta. A grande quantidade de inóculo inicial faz com que os níveis de doença, mesmo no início da epidemia, sejam elevados. O principal efeito da restrição sequencial na formação de estruturas infectivas em Toropi é observado na eficiência de infecção. Em Toropi, esta é cerca de 40 vezes menor do que no genótipo suscetível BRS 194. A menor eficiência de infecção resulta em uma menor quantidade de pústulas por planta (Figura 59). A consequência epidemiológica desta redução é a menor quantidade de esporos produzidos, resultando em menor taxa de infecção, atraso no início de epidemias e/ou, epidemias mais fracas.

Os níveis de inóculo inicial em epidemias causadas por ferrugens afetam a severidade, a taxa de progresso da doença e forma da curva de progresso (Roelfs *et al.*, 1992; Gilles & Kennedy, 2003). Epidemias que se iniciam com altas quantidades de inóculo apresentam os efeitos mais deletérios sobre o rendimento de grãos de trigo (Rao *et al.*, 1989).

A redução sequencial na formação de estruturas fúngicas em Toropi assemelha-se ao que foi observado nos genótipos não-hospedeiros (Figuras 24, 25 e 26). No entanto, a resistência parece atuar em momentos distintos em cada espécie de Poaceae estudada (Figura 23). O arroz é o cereal menos permissivo à *P. triticina*, tanto na fase de plântulas como de planta adulta. De acordo com Vlot *et al.* (2009), esta espécie possui altos níveis de ácido salicílico (AS) constitutivo. Como o AS está envolvido na sinalização para defesa à patógenos biotróficos e também no acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a menor permissividade à ferrugem pode ser resultado dos altos níveis de AS constitutivo presentes na planta. Esta concentração já elevada no momento de contato entre planta e

patógeno pode fazer com que as respostas de defesa ocorram de forma mais rápida do que nos outros cereais, interrompendo a infecção precocemente.

Para que as estruturas fúngicas diferenciem-se normalmente, é necessário que o fungo perceba sinais da planta. O controle sobre a percepção destes sinais se inicia com a indução da germinação do esporo e persiste até a formação de haustórios. Em não-hospedeiros ou em hospedeiros resistentes, a planta percebe a atividade ou os produtos fúngicos produzidos e ativa respostas de defesa. Em hospedeiros suscetíveis estas respostas de defesa são suprimidas e o desenvolvimento fúngico ocorre normalmente (Heath, 1997).

A investigação das respostas de resistência à ferrugem da folha do trigo em hospedeiros e não-hospedeiros revelou que os genótipos possuem diferentes mecanismos de defesa, expressos em intensidades e fases distintas do processo infeccioso.

Em plântulas, a morte celular esteve associada a 80% das tentativas de infecção em BRS 195, 120 hai. Nos demais genótipos não houve ocorrência expressiva de morte celular. URS 22 apresentou uma coloração mais intensa com *Trypan Blue* em 7,7% das células do mesófilo em contato com CMHs (Figura 39). Porém, esta reação não foi considerada uma morte celular, visto que apenas a parede celular da célula apresentou uma coloração diferenciada, podendo ser relacionada ao acúmulo de compostos de defesa e a morte da própria CMH do fungo (Figura 38).

Em genótipos de trigo com resistência parcial à *P. striiformis* é relatada a ocorrência de coloração mais intensa na parede celular de células em contato com CMHs, esta coloração escura está associada ao acúmulo de material granular e ao enrijecimento das paredes celulares (Ma & Shang, 2009). Além de corar a parede



celular do fungo, *Trypan Blue* cora células da planta onde a membrana plasmática foi comprometida (Melichar *et al.*, 2008).

Em 120 e 240 hai, o genótipo suscetível BRS 194 apresentou algumas células necróticas associadas à intensa colonização dos tecidos. Estas células provavelmente morreram pela exaustão de nutrientes devido ao progresso da infecção, não estando relacionadas com a defesa. Jagger *et al.* (2011) também relatam a ocorrência de morte celular em plantas suscetíveis, 264 hai com *P. striiformis*.

De acordo com estes resultados, pode-se inferir que a morte celular é o principal mecanismo de resistência à *P. triticina* apresentado pelo genótipo de cevada BRS 195, na fase de plântula. O mesmo não é observado na fase de planta adulta, já que a infecção parece ser paralisada após a formação de VSEs. A cevada é considerada um hospedeiro ocasional para *P. triticina*, já que alguns genótipos, na fase de plântula, podem apresentar pequenas pústulas de resistência (Niks *et al.* 1996). A resistência neste caso pode envolver mecanismos pré e pós-haustoriais (Neu *et al.*, 2003). A baixa taxa de formação de haustórios em cevada (inferior a 10%) associada à ocorrência de morte celular confirma isto.

A RH geralmente ocorre quando plantas hospedeiras, possuidoras de genes de resistência específicos, reconhecem efetores específicos produzidos pelo patógeno. No entanto, esta reação pode ocorrer em espécies não-hospedeiras, onde genes de resistência específicos estão ausentes. Uma possível explicação é a de que patógenos biotróficos mantiveram características que induzem a morte celular ao longo da evolução. Sendo assim, a RH é a principal defesa a ser evitada por fungos biotróficos em espécies hospedeiras (Niks & Dekens, 1991; Heath, 1997; Montesanto *et al.*, 2003).

Em não-hospedeiros a morte celular pode ser induzida pela produção de ROS em razão do reconhecimento de elicitores não específicos do patógeno, como proteínas,

peptídeos e lipídios (Montesanto *et al.*, 2003). Esta morte celular é induzida de forma não-específica pela atividade fúngica, durante a penetração, tanto em hospedeiros suscetíveis, como resistentes. Assumindo que a rota de transdução de sinais que leva a RH em diferentes patossistemas compartilha de algumas características comuns, é possível que diferentes elicitores, produzidos em diferentes estruturas fúngicas, influenciem a intensidade e a qualidade da resposta de RH em diferentes hospedeiros. Por isso, o processo de morte celular não é necessariamente o mesmo que ocorre durante a RH em hospedeiros e não envolve, necessariamente, a interação de genes *R* e genes *Avr* (Heath, 1997; Niks & Marcel, 2009).

Moerschbacher *et al.* (1990) relatam a ocorrência de lignificação associada com RH na interação de não-hospedeiro envolvendo trigo e *P. coronata* f. sp. *avenae*. Análises em microscopia demonstraram que a maioria das colônias desenvolveu estruturas infectivas intercelulares, incluindo CMHs e haustórios nas células do mesófilo de trigo. Porém, as células penetradas tornaram-se necróticas. Estes resultados sugerem que a resistência de trigo à *P. coronata* se assemelha ao mecanismo de resistência raça específico de variedades de trigo altamente resistentes à ferrugem do colmo e da folha. A ocorrência de RH também é relatada nas interações de não-hospedeiro entre centeio e *P. hordei*, trigo e *P. hordei* e arábida e *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Niks & Dekens, 1991; Lipka *et al.*, 2005).

Não se descarta, porém, o envolvimento de genes *R* na resistência de BRS 195 à *P. triticina*. O possível envolvimento de genes *R* é especulado na resistência de não-hospedeiro de cevada a diversas espécies de *Puccinia*. Um gene *R*, baseado em RH à *P. hordei-secalini* foi identificado neste cereal. Em alguns acessos de cevada ocorre a formação de colônias visíveis em razão da inoculação com fungos heterólogos, sugerindo que alguns haustórios se formam com sucesso. Porém, estas pequenas

pústulas são associadas à RH (Atienza *et al.*, 2004; Jafary *et al.*, 2006). O genótipo BRS 195 também apresentou pequenas pústulas de resistência e em análises microscópicas, estas se mostraram associadas à morte celular (Figura 40).

Em planta adulta, a morte celular esteve associada a todas as tentativas de infecção em *Lr9*. Em Toropi, 120 hai (5 dias após a inoculação), 37% das tentativas de infecção estiveram associadas à morte celular (Figura 42). Contrastando com o resultado observado em Toropi, os genes de resistência parcial *Lr34* e *Lr46*, apesar de restringirem o desenvolvimento do fungo nas fases iniciais do processo infeccioso, não estão associados com a indução de morte celular (Martínez *et al.*, 2001).

O mecanismo de morte celular é responsável pela resistência específica à raças do genótipo *Lr9*. A morte celular associada à RH geralmente é mediada pela interação genética entre o produto do gene de resistência (*R*) e o produto do gene de avirulência do patógeno, é pós-haustorial e regulada por inúmeros genes de defesa, que produzem um ambiente desfavorável ao patógeno, próximo ao local de penetração (Montesanto *et al.*, 2003; Rojas-Molina *et al.* 2007).

O gene *Lr9* não tem origem em trigo, é derivado de *Aegilops umbellulata* Zuch. e foi introduzido em trigo no ano de 1956. Orczyka *et al.* (2010) especulam que este gene pode ser parte da resistência de não-hospedeiro de *Aegilops* e por isso, potencialmente durável, mesmo que confira uma resistência pós-haustorial. No entanto, a frequência de virulência para este gene está aumentando gradativamente em países da América do Norte. No Canadá, no ano de 2000, não era relatada virulência para este gene, porém, em 2009, a frequência de virulência aumentou para 20%. Na América do Sul a virulência para este gene ainda é baixa (Huerta-Espino *et al.*, 2011).

A ocorrência de morte celular em 37% das tentativas de infecção no genótipo com resistência parcial Toropi é um indicativo de que diferentes mecanismos de

resistência estão combinados neste genótipo (Figura 36). Acredita-se que esta morte celular ocorra após a formação de haustórios, embora estes não tenham sido visualizados. Há ainda, a possibilidade de a morte celular ter ocorrido sem a formação de haustórios. Sillero & Rubiales (2002) relatam a ocorrência de necrose, 4 dias após a inoculação de *U. viciae-fabae*, em genótipos de fava com resistência de planta adulta. A necrose foi observada pelo escurecimento do conteúdo celular (coloração com *Trypan blue*). No entanto, nem sempre foi possível visualizar se havia formação de haustórios no interior das células. Vaz Patto & Rubiales (2009) descrevem que nem todas as células necróticas contêm haustórios e que a necrose pode ser induzida, aparentemente, pelo contato da HF ou CMH, sem penetração.

A morte celular em Toropi pode ser considerada tardia, visto que, diferentemente do que é observado em *Lr9*, ocorre em fases mais avançadas do processo infeccioso.

Muitos autores relataram a ocorrência de morte celular em patossistemas envolvendo ferrugens e genótipos com resistência parcial. Especula-se que a resistência parcial pode ser derivada de um mecanismo de resistência similar ao da resistência raça-específica, ao menos em nível ultra-estrutural. As principais diferenças seriam a frequência e intensidade da morte celular. Em genótipos com resistência parcial a morte celular seria imperceptível a olho nú, manifestando-se somente microscopicamente (Ma & Shang, 2009).

Kowalsa & Niks (1999) observaram este fenômeno em linho e referem-se a este tipo de morte celular como sendo uma hipersensibilidade incompleta, que ocorre apenas em algumas células e é expressa em fases mais adiantadas do processo infeccioso. Jiang & Kang (2010) relatam alterações ultra-estruturais nas células do genótipo de trigo com resistência parcial Libellula, quando inoculado com *P. striiformis*. As alterações

ocorrem três dias após a inoculação, e diferenciam o mesmo do genótipo suscetível. Estas incluem a plasmólise de células em contato com HFs ou que formaram haustórios. De quatro a seis dias após a inoculação inicia-se a degeneração das membranas dos tilacóides, rompimento da membrana dos cloroplastos e a morte celular.

Na resistência parcial de *Lathyrus sativus* a *U. pisi*, há uma redução nas taxas de germinação e formação de ASEs, em relação ao genótipo suscetível. Porém, estas diferenças não são suficientes para explicar os níveis de resistência. O abortamento precoce de colônias após a formação de VSEs, associado à restrição do crescimento de hifas intercelulares, são os eventos mais importantes na resistência pré-haustorial. Ainda, há menor formação de haustórios e ocorrência de morte celular em alguns locais de tentativa de infecção. Neste caso, a morte celular ocorreu antes da formação de haustórios (Vaz Patto & Rubiales, 2009).

A cultivar de aveia URS 21 apresenta a morte celular tardia como mecanismo de resistência parcial à *P. coronata* (Graichen, 2009). A morte celular tardia (120 hai) também é relatada na resistência parcial de trigo à *P. striiformis*, durante o processo de extensão de hifas. Em estádios avançados da infecção, algumas células do mesófilo apresentam respostas hipersensitivas similares à de cultivares com resistência total (Ma & Shang; 2009). Dois QTLs (*QPst.jic-4B* e *QPst.jic-2D*) são responsáveis pela resistência de planta adulta da cultivar de trigo Alcedo. Quando estudados de forma isolada, verificou-se que ambos condicionam morte celular nos locais de infecção. Porém, este fenômeno variou quantitativa e temporalmente. Na presença dos dois QTLs a morte celular foi restrita a 1-3 células. Nas linhas contendo apenas um dos QTLs a morte celular foi extensa. Ainda, linhas com *QPst.jic-2D* apresentaram morte celular cerca de 72 hai, enquanto que nas linhas contendo *QPst.jic-4B* a morte celular foi mais expressiva 120 hai. Especula-se que estes QTLs reconheçam genes de avirulência vitais

para o patógeno, mutações nestes genes poderiam resultar em perda de viabilidade do mesmo. Isto explicaria a durabilidade da resistência em Alcedo, cultivada desde 1975 em países europeus (Jagger *et al.*, 2011). A morte celular também é relatada em outros patossistemas onde a resistência é considerada de planta adulta, como do gene *CF9b* para resistência a *Cladosporium fulvum* e *Xa21* para *Magnaporthe grisea* (Century *et al.*, 1999; Panter *et al.*, 2002).

Nem sempre mecanismos pré ou pós-haustoriais ocorrem de forma isolada, em alguns genótipos estes mecanismos podem ocorrer simultaneamente. Este é o caso da resistência de *Triticum monococcum* L. à *P. triticina*. Neste cereal, a primeira linha de defesa é pré-haustorial e envolve a formação de papilas. Quando há falha na formação de papilas e algumas unidades infectivas conseguem formar haustórios, entra em ação uma segunda linha de defesa, pós-haustorial e baseada na RH, ocasionando a morte da célula. Quando ambos os mecanismos falham, algumas pústulas são formadas. A cultivar de trigo Kariega, possuidora de resistência de planta adulta, apresenta uma combinação de mecanismos pré (lignificação) e pós-haustoriais (morte celular não hipersensitiva) (Moldenhauer *et al.*, 2008). Na interação de não-hospedeiro envolvendo *Arabidopsis* e *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* a combinação de mecanismos pré e pós-haustoriais de defesa também é relatada (Anker & Niks, 2001; Lipka *et al.*, 2005).

Da mesma forma, a resistência de Toropi parece envolver mecanismos pré e pós-haustoriais. A combinação destes mecanismos resulta na redução sequencial da formação de estruturas fúngicas e na ocorrência de morte celular tardia, sendo responsável pela menor eficiência de infecção observada em Toropi, quando comparada com um genótipo suscetível. Ainda, em alguns locais onde as respostas de defesa não são expressas na intensidade ou tempo exatos, algumas pústulas de suscetibilidade são formadas. O envolvimento de diferentes mecanismos de resistência, atuantes desde a

deposição de esporos até a formação de haustórios é relatada por Vaz Patto & Rubiales (2009).

A penetração na parede celular geralmente não é barreira para patógenos adaptados. No entanto, em casos onde a planta não é um hospedeiro, os patógenos geralmente falham na penetração da célula. A formação de haustórios pode ser prevenida pela formação de papilas nas células do mesófilo. Estas atuam como barreira física e química à penetração e possuem uma matriz de calose, contendo vários constituintes orgânicos e inorgânicos, incluindo proteínas antimicrobianas e compostos fenólicos autofluorescentes (Lipka *et al.*, 2005; O'Connell & Panstruga, 2006; Rojas-Molina *et al.*, 2007).

No genótipo de aveia (URS 22), o principal mecanismo de resistência à *P. triticina* é a formação de papilas (Figura 44). Estas foram observadas em 75% dos locais de contato de CMHs com células do mesófilo da planta. Este tipo de resistência é comum em interações envolvendo não-hospedeiros (Rubiales & Niks, 1992). O acúmulo de calose (componente mais abundante da papila) e formação de papilas também é relatado em hospedeiros, como é o caso de trigo com resistência à *P. graminis* f.sp *tritici*, *P. triticina* e *P. striiformis* (Jacobs, 1989b; Tiburzy & Reisener, 1990; Kang *et al.* 2002) e em cevada com resistência à *P. hordei* (Niks, 1986).

O acúmulo de compostos autofluorescentes em resposta à penetração por fungos fitopatogênicos é comum em diversas interações. A natureza desta fluorescência é atribuída à presença de compostos de natureza fenólica. Estes compostos fenólicos associados à defesa podem levar à lignificação das paredes celulares e até a morte celular por hipersensibilidade (Mauch-Mani & Slusarenko, 1996; von Röpenack *et al.*, 1998; Rojas-Molina *et al.*, 2007).

Tanto em plântulas como em plantas adultas, houve um aumento na produção de compostos autofluorescentes entre 48 e 120 hai. Esta produção variou temporal e quantitativamente entre os genótipos e esteve correlacionada negativamente com a formação de colônias e tecido esporogênico (Figuras 46 e 48). A produção de compostos autofluorescentes foi relacionada com a resistência dos genótipos não-hospedeiros testados na fase de plântula, especialmente em cevada e arroz, onde se verificou a ocorrência de várias células fluorescentes associadas à tentativas de infecção por *P. triticina*. Em aveia a fluorescência foi mais fraca, embora sempre associada aos estômatos e algumas vezes, às VSE formadas (Figura 47). O genótipo suscetível BRS 194 apresentou baixo acúmulo de compostos autofluorescentes em 48 hai. Em 120 hai, cerca de 80% dos estômatos penetrados apresentaram uma fluorescência fraca (Figura 46).

No entanto, em planta adulta, o genótipo suscetível apresentou proporção de células autofluorescentes inferior a 10%. Além disso, a resposta do genótipo de cevada (BRS 195) diferiu da observada em plântulas. Em planta adulta, apenas em 120 hai houve a produção de compostos fluorescentes, porém, em baixa intensidade, onde somente o estômato foi fluorescente. Nos genótipos hospedeiros com resistência parcial (Toropi) e com resistência específica à raças houve uma alta proporção de tentativas de infecção associadas ao acúmulo de compostos autofluorescentes. Este acúmulo já foi observado em 36 hai e aumentou no decorrer do tempo, sendo mais expressivo em *Lr9* do que em Toropi (Figuras 48 e 49).

A autofluorescência em células do mesófilo pode estar associada com a morte celular, com a lignificação e com a formação de papilas (Moerschbacher *et al.*, 1990; Rojas-Molina *et al.*, 2007; Bozkurt *et al.*, 2010). Podem ser distinguidos dois padrões de produção de compostos autofluorescentes relacionados com o acúmulo de compostos



fenólicos: somente nas paredes das células ou, em toda a célula. Este último estaria relacionado com a morte celular (Southerton & Deverall, 1990; Tiburzy & Reisener, 1990; Stadnik & Buchenauer, 1999). Neste trabalho houve alta correlação entre a presença de compostos autofluorescentes e o acúmulo de ROS em plântulas (Tabela 25) e entre a presença de compostos autofluorescentes e morte celular em plantas adultas (Tabela 24 e 26).

Bozkurt *et al.* (2010) relatam diferenças temporais e quantitativas na proporção de células autofluorescentes associadas com tentativas de infecção por *P. striiformis* em genótipo suscetível e com resistência específica à raças. No genótipo resistente a autofluorescência foi verificada em 24 hai. Em 48 hai, 40% das tentativas de infecção estiveram associadas à autofluorescência de células do mesófilo, enquanto que na suscetível a taxa foi inferior a 10%, além de envolver poucas células. Neste caso, a autofluorescência foi relacionada com a morte celular hipersensível. Os resultados apresentados por esses autores assemelham-se aos obtidos neste trabalho, inclusive em termos de porcentagens.

A formação de papilas em URS 22 pode estar relacionada com a produção de compostos autofluorescentes pelas células. Kruger *et al.* (2002) descrevem evidências da importância de compostos fenólicos e produtos da biossíntese de ligninas ou da síntese de intermediários de fenilpropanóides na formação de papilas. Nas interações envolvendo oídios dos cereais, a intensidade de autofluorescência pela presença de compostos fenólicos nas células da epiderme esteve correlacionada com a formação de papilas nas mesmas (Jacobs, 1989b; Ma & Shang, 2004; Rojas-Molina *et al.* 2007).

Como observado em Toropi, Rojas-Molina *et al.* (2007) relatam a associação de células autofluorescentes em tentativas de infecção por *U. viciae-fabae* em genótipos com resistência parcial de *V. faba*. O mesmo foi evidenciado em genótipos de aveia

com resistência parcial à *P. coronata* e *Erysiphe graminis* f. sp. *avenae* (Parry & Carver, 1986; Graichen, 2009).

Outra resposta de defesa importante é a produção de ROS. Esta produção pode ser detectada dentro de minutos após o ataque por um patógeno, virulento ou avirulento. As ROS mais importantes são o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), o radical hidroperóxido ( $\text{HO}_2\cdot$ ), o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ) e o óxido nítrico (NO). Essas ROS são altamente reativas e tóxicas e quando se acumulam em grande quantidade, induzem a RH. Além disso, participam da sinalização e ativação de genes de defesa e dos processos de enrijecimento da parede celular da planta, promovendo sua lignificação. Podem atuar ainda, como compostos antimicrobianos, inibindo diretamente o crescimento do patógeno (Brisson *et al.*, 1994; Heath, 2000; Neill *et al.*, 2002; De Gara *et al.*, 2003; Laloi *et al.*, 2004; Shetty *et al.*, 2008). Porém, patógenos biotróficos desenvolveram mecanismos para conviver com este estresse oxidativo, incluindo a síntese e secreção de proteínas antioxidantes, como catalases e peroxidases e a geração de metabólitos que agem como detoxificadores de ROS (Zhang *et al.*, 2004; O'Connell & Panstruga, 2006).

Uma das principais diferenças entre plantas suscetíveis e resistentes é o tempo em que estas levam para reconhecer o patógeno e ativar as respostas de defesa. No caso de plantas resistentes o reconhecimento é rápido e pode ativar uma série de outros genes de defesa, a fim de impedir a colonização dos tecidos. Nas plantas suscetíveis a resposta é mais lenta e menos intensa, incapaz de restringir o crescimento do patógeno. Duas fases distintas de produção de ROS podem ser identificadas durante as interações patógeno-hospedeiro. A primeira ocorre logo após o contato do fungo com a planta, tanto em plantas resistentes quanto suscetíveis. A segunda fase, chamada de explosão

oxidativa, ocorre somente em plantas resistentes, algumas horas após o contato com o patógeno (Manickavelu *et al.*, 2010).

Neste trabalho, a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> esteve correlacionada negativamente com a formação de colônias e tecido esporogênico em plântulas e plantas adultas (Tabelas 25 e 26). Na fase de plântula, o genótipo de cevada (BRS 195) apresentou um pico na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre 48 e 72 hai (superior a 80%). Provavelmente esta maior produção está associada à ocorrência de morte celular, verificada em grande parte das tentativas de infecção neste genótipo. Em aveia (URS 22) e trigo (BRS 194), as taxas de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram abaixo de 40%, com exceção de BRS 194, em 96 hai, onde 55% das tentativas de infecção estiveram associadas à produção de ROS nos estômatos (Figura 50). Este acúmulo tardio provavelmente não ocorre em tempo hábil de impedir a infecção. O acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células da epiderme ou nos estômatos de plantas suscetíveis também é relatado por Orczyka *et al.* (2010), entre 4 e 5 dias após a inoculação.

Nos genótipos de arroz (Irga 417 e Nippon Bare), além da alta proporção de células com autofluorescência, a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi superior a 60% em todos os horários testados. Ayllife *et al.* (2011) relatam que as respostas de defesa deste cereal à ferrugens incluem a produção de compostos autofluorescentes, de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a deposição de calose e em alguns casos, a morte celular. Os autores avaliaram 9.000 linhagens e cultivares de arroz. Destas, 3% são oriundas da América do Sul e a grande maioria, variedades asiáticas (66%). Em 34 linhagens (nenhuma proveniente da América do Sul) houve a manifestação de algum sinal macroscópico de infecção (*flecks* de clorose), demonstrando que há variabilidade genética para a resistência de não-hospedeiro à ferrugens. A variação também ocorreu dentro da mesma folha, onde diferentes pontos

permitiram maior ou menor desenvolvimento fúngico. No presente trabalho, nenhum dos genótipos de arroz testados apresentou sinais visíveis da infecção do patógeno.

Na fase de planta adulta, assim como em plântulas, BRS 195 apresentou alta taxa de produção de  $H_2O_2$ , a partir de 48 hai. Esta produção aumentou gradativamente no decorrer do tempo. O genótipo *Lr9* apresentou um pico de produção de  $H_2O_2$  em 48 hai, coincidindo com o período de formação de haustórios (Figura 52). Estes resultados estão de acordo com o que é relatado por Manickavelu *et al.* (2010), onde a produção de ROS foi determinante nas respostas de incompatibilidade da linhagem isogênica *Lr10* com o fungo *P. triticina*. A formação de  $H_2O_2$  em *Lr9* também foi estudada por Orczyka *et al.* (2010). Os autores relatam que neste genótipo a queima oxidativa é pequena e transiente, atingindo seu pico (60-70%) dois dias após a inoculação.

Em BRS 194 a produção de  $H_2O_2$  foi baixa e restrita ao estômato penetrado. A reação com DAB pode ocorrer ocasionalmente em plantas suscetíveis, porém, em níveis não significativos (Melichar *et al.*, 2008). A geração fraca e transiente de ROS ocorre devido a uma reação biológica não-específica. Depois de algumas horas do contato entre planta e patógeno, uma segunda e prolongada produção de ROS é detectada (queima oxidativa) e ocorre nas células atacadas por patógenos avirulentos. Esta produção em duas fases é típica de interações incompatíveis, caracterizadas pela presença de RH (Lamb & Dixon, 1997). O acúmulo de  $H_2O_2$  nas células guarda dos estômatos, como verificado em BRS 194 e URS 22, também é relatado por Wang *et al.* (2010) (Figuras 51 e 53).

Em Toropi praticamente não houve a formação de  $H_2O_2$  nos locais de tentativa de infecção. Silva (2006), ao estudar genes envolvidos na defesa, logo após o contato com o patógeno, relata que aparentemente, não há explosão oxidativa neste genótipo. A ausência de produção de  $H_2O_2$  também é relatada na cultivar Guardian, com resistência

parcial à *P. striiformis* f. sp. *tritici* e na reação do gene *Lr34* à *P. triticina* (Melichar *et al.*, 2008; Orczyka *et al.*, 2010).

Estes resultados demonstram que distintos mecanismos de resistência estão envolvidos em diferentes fases do desenvolvimento dos diferentes genótipos (Tabela 20). Apesar de haver alguma redução na formação de ASEs nos genótipos de arroz, que pode ser indicativo de um mecanismo de defesa passivo que reduz o reconhecimento de estômatos, em todos os genótipos não-hospedeiros testados, houve o envolvimento de respostas ativas de defesa. Estas incluem a morte celular, a formação de papilas, produção de compostos autofluorescentes e ROS. De acordo com Ayliffe *et al.* (2011), a resistência de não-hospedeiros é multifacetada e envolve mecanismos de resistência físicos, químicos, pré-formados e ativos.

Estudos recentes demonstram que a resistência de não-hospedeiros é herdada poligenicamente e envolve respostas ativas, incluindo a sinalização por ácido salicílico e produção de ROS. Estes eventos bioquímicos também são comuns na resistência de hospedeiros (Aghnoum & Niks, 2010; Ayliffe *et al.*, 2011).

De acordo com Zhang *et al.* (1994), genes que conferem resistência parcial à *P. hordei* em cevada também conferem resistência à fungos não apropriados, como *P. triticina*. Esta similaridade permite que se possa especular a transferência de genes de resistência de não-hospedeiros para espécies hospedeiras. O primeiro exemplo de transferência de um gene de não-hospedeiro entre espécies ocorreu entre milho e arroz. O gene *Rxo1* que confere resistência baseada em RH à *Burkholderia andropogonis* Smith. foi transferido para arroz, onde conferiu resistência à *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* Ishiyama., um não-patógeno de milho. Neste caso, a diferença entre a forte RH e a aparente imunidade ao não-patógeno parece ser um único gene NBS-LRR (*Rxo1*) (Zhao *et al.* 2005).

As respostas de defesa à *P. triticina* apresentadas pelo genótipo de cevada BRS 195, assemelham-se ao que é observado em genótipos de trigo com resistência específica à raças. Em termos evolutivos, estes cereais são mais aproximados do que trigo e aveia ou trigo e arroz. Consequentemente, os patógenos *P. triticina* e *P. hordei* são mais próximos do que *P. triticina* e *P. coronata* (Zambino & Szabo, 1993; Kellogg, 2000; Van Der Merwe *et al.*, 2007).

Niks & Dekens (1991) relatam que a resistência de trigo à *P. hordei* envolve primeiramente mecanismos pré-haustoriais de defesa. Além destes, são atuantes mecanismos pós-haustoriais, que induzem a morte celular. Esse resultado, somado ao deste trabalho, para o genótipo não-hospedeiro BRS 195, assemelha-se ao que foi observado no genótipo com resistência parcial, Toropi.

Desta forma, as resistências de não-hospedeiro, quantitativa e qualitativa seriam apenas extremos distintos de um mesmo contínuo de resistência (Niks & Marcel, 2009).

Embora os mecanismos que determinam a resistência de não-hospedeiros não estejam completamente elucidados, para que um patógeno em potencial consiga colonizar com sucesso a planta, faz-se necessário transpor algumas barreiras de defesa. Primeiramente, é necessário que haja compatibilidade básica entre planta e patógeno, ou seja, a presença de sinais físicos e químicos apropriados para que o patógeno reconheça a planta como um possível hospedeiro. Nesta fase, barreiras físicas e químicas (fitoanticipinas) devem ser transpostas, a fim de diferenciar as estruturas infectivas de forma adequada. Os patógenos produzem uma gama de moléculas conservadas (PAMPs) que são responsáveis pela indução das respostas de defesa. Para que a infecção tenha sucesso, o patógeno deve inativar estas defesas, através da liberação de proteínas efetoras que interagem com os processos de defesa. Quando o patógeno consegue inativar a resistência basal, mediada por PAMPs, a infecção é estabelecida.

Em algumas espécies o patógeno é incapaz de suprimir esta resistência, assim, estas plantas são consideradas não-hospedeiras (Jafary *et al.*, 2006; Niks & Marcel, 2009; Ayllife *et al.*, 2011).

Mesmo havendo conservação entre PAMPs e os receptores PRRs, a ferrugem do centeio (*P. recondita*), por exemplo, é capaz de suprimir as respostas de defesa neste cereal, porém, é incapaz de infectar o trigo (Niks & Dekens, 1991). Claramente, existem vários fatores específicos envolvidos, tanto na planta como no patógeno, determinando até que ponto a defesa basal será suprimida em diferentes espécies. Uma das questões chave para o entendimento das relações patógeno-hospedeiro é desvendar de que forma os patógenos suprimem a resistência basal em hospedeiros e porque este fenômeno não ocorre em espécies não-hospedeiras relacionadas, como é o caso das espécies de Poaceae testadas neste trabalho.

Mesmo dentro da mesma espécie de planta, existe variação genética na proporção de defesa basal suprimida por patógenos. Este é o caso da resistência parcial, denominada por Parlevliet (1975). Em genótipos com este tipo de resistência o patógeno parece ter dificuldade de suprimir completamente a resistência basal. Além disso, parece haver associação entre níveis de resistência parcial à *P. hordei* em genótipos de cevada e a resistência a fungos heterólogos (Hoogkamp *et al.*, 1998). Com estes resultados, sugere-se que há associação genética entre a resistência de hospedeiro e não-hospedeiro em cevada, onde ambas atuam sobre os níveis de compatibilidade básica (capacidade do patógeno de “suportar” as defesas empregadas pela planta, efetivas contra patógenos não adaptados) e seu fenômeno complementar, a resistência basal (Jafary *et al.*, 2006; Niks & Marcel, 2009).

Embora as resistências qualitativa e quantitativa sejam fenômenos diferentes, existem evidências de que podem ser condicionadas pelos mesmos mecanismos

genéticos. Alguns mecanismos da resistência quantitativa se sobrepõem aos da resistência qualitativa (reconhecimento específico de efetores do patógeno) e da resistência basal (reconhecimento não-específico de PAMPs). Além destes mecanismos, a resistência quantitativa pode envolver rotas e mecanismos alternativos como a detecção de danos causados pelo patógeno e a modulação e transdução de sinais para reforço de paredes celulares, produção de metabólitos secundários relacionados à defesa e detoxificação de toxinas derivadas do patógeno. Estes mecanismos possuem implicação sobre o espectro da resistência e sua durabilidade. Mecanismos de reconhecimento específicos podem eventualmente ser superados como resultado da evolução do patógeno, enquanto que mecanismos de defesa não-específicos podem oferecer uma resistência de amplo espectro e mais robusta em face à evolução do patógeno (Poland *et al.*, 2008).

A resistência quantitativa ainda é pouco explorada (Kliebenstein & Rowe, 2009). Estudos histológicos das interações *Puccinia* x Poaceae podem auxiliar no conhecimento sobre os vários mecanismos de resistência e na obtenção de formas de controle mais duráveis. Acredita-se que muitos mecanismos ainda não tenham sido explorados, incluindo os envolvidos na menor deposição de esporos, na redução da germinação e no desenvolvimento de ASEs e VSEs. Através do conhecimento de quais mecanismos operam e quais possuem maior durabilidade, pode-se especular a combinação de diferentes mecanismos de resistência em um único genótipo de interesse agrônômico (Rubiales & Niks, 2000; Vaz Patto & Rubiales, 2009).

Mecanismos atuantes em diferentes fases do processo infeccioso podem fornecer múltiplas barreiras, não facilmente transpassadas por uma simples mutação no patógeno (Rubiales & Niks, 2000; Kliebenstein & Rowe, 2009). Esta combinação de mecanismos



resulta em uma robustez da resposta de defesa (Lipka *et al.*, 2005). Os resultados encontrados neste trabalho corroboram com isto.

A cultivar de trigo Toropi foi lançada em 1965 e cultivada extensivamente por cerca de 15 anos (Rosa *et al.*, 2009). No entanto, ainda é utilizada como testemunha para resistência parcial em ensaios experimentais da Embrapa Trigo para avaliação de resistência à ferrugem da folha. Estes ensaios são conduzidos em diferentes regiões, com diferentes condições ambientais. Apesar da grande variabilidade de raças do patógeno existentes, Toropi tem mostrado o mesmo padrão de reação à ferrugem da folha ao longo de todos os anos em que foi testada, com baixa taxa de progresso da doença, tipo de infecção suscetível e severidade em torno de 5% (Chaves, 2011, comunicação pessoal). De acordo com Singh *et al.* (2011), o atraso no progresso da doença, com severidade variando de traços até 5%, é indicio do efeito cumulativo de 4-5 genes menores de resistência, resultando em uma “quase imunidade”.

A estabilidade da resistência de Toropi a diferentes raças de *P. triticina* ao longo do tempo, a baixa severidade observada no campo e a presença de distintos mecanismos de resistência a nível celular, são indicativos de que este genótipo realmente possui resistência parcial. Frente a este cenário, a avaliação de mecanismos de resistência em genótipos com resistência durável, como é o caso de Toropi, deve ser priorizada. Genótipos que combinem diferentes mecanismos de resistência, preferencialmente pré-haustoriais (a exemplo do que é observado em espécies não-hospedeiras e em Toropi), apresentarão, potencialmente, resistência mais durável à *P. triticina* do que genótipos com resistência baseada somente em hipersensibilidade.

## 7 CONCLUSÕES

Nas condições em que foram conduzidos os experimentos realizados neste trabalho, conclui-se:

1. A expressão da resistência à *Puccinia triticina* difere temporal e espacialmente entre os genótipos hospedeiros e não-hospedeiros;

2. Genótipos hospedeiros com distintas reações de resistência (específica à raça e não-específica à raça) apresentam diferentes mecanismos de resistência à *P. triticina*. Da mesma forma, as diferentes espécies não-hospedeiras possuem distintas respostas de resistência ao fungo;

3. O principal mecanismo envolvido na resistência apresentada pelo genótipo de trigo Toropi é pré-haustorial, reduzindo efetivamente e sequencialmente as estruturas fúngicas diferenciadas, em comparação ao genótipo suscetível. Este mecanismo é ativo e envolve a produção de compostos autofluorescentes, mas não de espécies reativas de oxigênio. Concomitante ao acúmulo de compostos autofluorescentes há a ocorrência de morte celular tardia em alguns locais onde a infecção teve sucesso (mecanismo pós-haustorial). A combinação de diferentes mecanismos de resistência é responsável pela durabilidade da resistência de Toropi;

4. Em alguns locais da folha de Toropi, onde há falha na manifestação dos mecanismos pré e pós-haustoriais de resistência, poucas pústulas são formadas. Isto se

reflete na reação fenotípica do genótipo, de poucas pústulas de suscetibilidade;

5. A resistência observada nos genótipos não-hospedeiros é ativa;

6. Os genótipos de arroz podem ser os únicos a apresentar algum tipo de resistência estrutural, visto que sua estrutura foliar difere dos demais genótipos e a infecção é restringida de forma mais drástica. Nestes, a resistência à *P. triticina* é pré-haustorial e envolve a produção de compostos autofluorescentes e de espécies reativas de oxigênio;

7. O genótipo de aveia URS 22 apresenta resistência do tipo pré-haustorial associada à produção de compostos autofluorescentes e à formação de papilas. O genótipo de cevada BRS 195 possui a combinação de mecanismos pré e pós-haustoriais, visto que além da produção de compostos autofluorescentes e de espécies reativas de oxigênio, apresenta morte celular.

8. A combinação de distintos mecanismos de resistência à *P. triticina*, atuantes em diferentes fases do processo infeccioso, pode ser responsável pela durabilidade da resistência em genótipos hospedeiros, como Toropi. O mesmo ocorre em genótipos não-hospedeiros.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHNOUM, R.; NIKS, R.E. Specificity and levels of nonhost resistance to nonadapted *Blumeria graminis* forms in barley. **New Phytologist**, Cambridge, v. 185, p. 275-284, 2010.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5. ed. San Diego: Elsevier Academic. 2005. 922 p.

ALLEN, E.A.; HAZEN, B.E.; HOCH, H.C.; KWON Y., LEINHOS, G.M.E. Appressorium formation in response to topographical signals in 27 rust species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, p. 323-331, 1991.

ALVAREZ-ZAMORANO, R. **Patogenesis de *Puccinia recondita* Rob. Ex Desm. f. sp. tritici y la resistencia en trigo**. 1995. 76 f. Tese (Doutorado) - Montecillos Colegio Postgraduados, México, 1995.

ANKER, C.C.; NIKS, R.E. Prehaustorial resistance to the wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina* in *Triticum monococcum* (s.s.). **Euphytica**, Dordrecht, v. 117, p. 209-215, 2001.

ANNONE, J. G.; NISI, J. Situación de las royas del trigo en Argentina. In: SEMINARIO INTERNACIONAL RESISTENCIA A ROYAS EN TRIGO, 2003, La Estanzuela. **Resumenes**. La Estanzuela: INIA, 2003. p. 1.

ATIENZA, S.G.; JAFARY, H.; NIKS, R.E. Accumulation of genes for susceptibility to rust fungi for which barley is nearly a nonhost results in two barley lines with extreme multiple susceptibility. **Planta**, Germantown, v. 220, p. 71-79, 2004.

AUTRIQUE, E.; SING, R.P.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M.E. Molecular markers for four leaf rust resistance genes introgressed into wheat relatives. **Genome**, Toronto, v. 38, p. 75-83, 1995.

AYLIFFE, M.; JIN, Y.; KANG, Z.; PERSSON, M.; STEFFENSON, B.; WANG, S.; LEUNG, H. Determining the basis of nonhost resistance in rice to cereal rusts. **Euphytica**, Dordrecht, v. 179, p. 33-40, 2011.

BARCELLOS, A. L. **Ferrugem da folha do trigo: resistência de planta adulta (RPA)**. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, 2002. v. 1

BARCELLOS, A.L. **Genética da resistência de planta adulta à ferrugem da folha na cultivar brasileira de trigo Toropi (*Triticum aestivum* L. em Thell.** 1994. 163 f.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Fitotecnia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.

BARCELLOS, A.L.; MORAES FERNANDES, M.I.B. de; ROELFS, A.R. Ferrugem da folha do trigo (*Puccinia recondita*): durabilidade da resistência. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 23, p.101-111, 1997.

BARCELLOS, A. L.; ROELFS, A. P.; MORAES FERNANDES, M. I. B. Inheritance of adult plant leaf rust resistance in the Brazilian wheat cultivar Toropi. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 1, p. 90-93, 2000.

BARCELLOS, A. L.; CHAVES, M. S. Epidemias de ferrugem da folha em cultivares brasileiras de trigo – alterações na população do patógeno de 1993 a 2002. In: SEMINARIO INTERNACIONAL RESISTENCIA A ROYAS EN TRIGO, 2003, La Estanzuela. **Resúmenes**. La Estanzuela: INIA, 2003. p. 13.

BENDER, C.M.; PRETORIUS, F.J.; KLOPPERS, F.J.; SPIES, J.J. Histopathology of leaf rust infection and development in wheat genotypes containing *Lr12* and *Lr13*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, p. 65-76, 2000.

BENNETZEN, J. L.; MA, J. The genetic colinearity of rice and other cereals on the basis of genomic sequence analysis. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, p. 128-133, 2003.

BENT, A. F.; MACKEY, D. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 399-436, 2007.

BISCHOF, M.; EICHMANN, R.; HÜCKELHOVEN, R. Pathogenesis-associated transcriptional patterns in *Triticeae*. **Journal of Plant Physiology**, Leipzig, v. 168, p. 9-19, 2011.

BOLTON, M.D.; KOLMER, J.A.; XU, W.W.; GARVIN, D.F. *Lr34*-mediated leaf rust resistance in wheat: transcript profiling reveals a high energetic demand supported by transient recruitment of multiple metabolic pathways. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 21, p. 1515-1527, 2008.

BOZKURT, T. O.; MCGRANN, G. R. D.; MACCORMACK, R.; BOYD, L.A.; AKKAYA, M. S. Cellular and transcriptional responses of wheat during compatible and incompatible race-specific interactions with *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 11, p. 625–640, 2010.

BRAMMER, S.P. **Mapeamento de genes de resistência parcial à ferrugem da folha em cultivares brasileiras de trigo (*Triticum aestivum* L. em Thell)**. 2000. 105 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

BRISSON, L. F., TENHAKEN, R.; LAMB, C. Function of Oxidative Cross-Linking of Cell Wall Structural Proteins in Plant Disease Resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 1703-1712, 1994.

BROERS, L.H.M.; LÓPEZ-ATILANO, R.M. Effect of quantitative resistance in wheat on the development of *Puccinia striiformis* during early stages of infection. **Plant Disease**, Saint Paul v. 80, p. 1265-1268, 1996.

CAMARGO, L.E.A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: BERGAMIN, A.F.; KIMATI; AMORIM, L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 3 ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 470-492.

CENTURY, K.S.; LAGMAN, R.A.; ADKISSON, M. Developmental control of *Xa21*-mediated disease resistance in rice. **The Plant Journal**, Oxford, v. 20, 231-236, 1999.

CHAVES, M. S.; BARCELLOS, A. L. Situação das ferrugens do trigo no Brasil e comportamento das cultivares comerciais em 2002, 2001 e 2002. . In: SEMINARIO INTERNACIONAL RESISTENCIA A ROYAS EN TRIGO, 2003, La Estanzuela. **Resumenes**. La Estanzuela: INIA, 2003. p. 2.

CHISHOLM, S.T.; COAKER, G.; DAY, B.; STASKAWICZ, B.J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, Cambridge, v. 124, p. 803–814, 2006.

COLLINS, T.J.; MOERSCHBACHER, B.M.; READ, N.D. Synergistic induction of wheat stem rust appressoria by chemical and topographical signals. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 58, p. 259-266, 2001.

COLLINS, T.J.; READ, N.D. Appressorium induction by topographical signals in six cereal rusts. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 51, p. 169-179, 1997.

CORAM T. E.; SETTLES, M.; CHEN, X. Transcriptome analysis of high-temperature adult-plant resistance conditioned by *Yr39* during the wheat - *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* interaction. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 9, p. 479–493, 2008.

COUTINHO, T. A.; RIJKENBERG, F. H. J.; VAN ASCH, M. A. J. Appressorium formation by *Hemileia vastatrix*. **Mycological Research**, Amsterdam, v. 97, p. 951-956, 1993.

DANGL, J.L.; DIETRICH, R.A.; RICHBERG, M.H. Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 8, p. 1793–1807, 1996.

DE GARA, L.; PINTO, M.C.; TOMMASI, F. The antioxidante systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. **Plant Physiology and Biochemistry**, London, v. 41, p. 863-870, 2003.

de WIT P. J. G. M. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 64, p. 2726-2732, 2007.

DINNOR, A.; ESHED, N.; NOF, E. *Puccinia coronata*, crown rust of oat and grasses. In: ADVANCES in plant pathology: genetics of plant pathogenic fungi. California: Academic Press, 1988. 566 p.

DURBIN, R.D. Effects of rust on plant development in relation to the translocation of inorganic and organic solutes. In: BUSHNELL, W.R.; ROELFS, A.P. (Eds.) **The cereal rusts**. New York: Academic Press, 1984. v. 1, p. 509-528.

DYCK, P. L.; SAMBORSKI, D. J.; ANDERSON, R. G. Inheritance of adult-plant leaf rust resistance derived from the common wheat varieties Exchange and Frontana. **Canadian Journal of Genetics Cytology**, Ottawa, v. 8, p. 665-671, 1966.

DYCK, P. L. The association of a gene for leaf rust resistance with the chromosome 7Dsuppressor of stem rust resistance in common wheat. **Genome**, Toronto, v. 29, p. 467-469, 1987.

ELAHINIA, S.A. Microscopic study on expression of *Yr-18* gene related to adult plant resistance in a near-isogenic line of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to the Stripe Rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*). **Journal of Agriculture, Science and Technology**, Rasht, v. 10, p. 359-369, 2008.

ELLIS, J. Insights into Nonhost Disease Resistance: can they assist disease control in agriculture? **The Plant Cell**, Waterbury, v. 18, p. 523–528, 2006.

FERREIRA, J. F.; RIJKENBERG, F.H.J. Development of infection structures of *Uromyces transversalis* in leaves of the host and a non-host. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 67, p. 429-433, 1989.

GERMAN, S. Situación de las royas del trigo en Uruguay y comportamiento de cultivares comerciales. In: SEMINARIO INTERNACIONAL RESISTENCIA A ROYAS EN TRIGO, 2003, La Estanzuela. **Resúmenes**. La Estanzuela: INIA, 2003. p. 5.

GERMAN, S.; CHAVES, M.; CAMPOS, P.; VIEDMA, L.; MADARIAGA, R. Are rust pathogens under control in the Southern Cone of South America? In: 2009 TECHNICAL WORKSHOP – BGRI, 2009, Cd.Óbregon, Sonora, México. **Abstracts**. Cd.Óbregon, Sonora, México, 2009.

GILLES, T.; KENNEDY, R. Effects of an interaction between inoculum density and temperature on germination of *Puccinia allii* urediniospores and leek rust progress. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 413-420, 2003.

GOFF S. A.; RICKE, D.; LAN, T.H.; PRESTING, G.; WANG, R.; DUNN, M.; GLAZEBROOK, J.; SESSIONS, A.; OELLER, P.; VARMA, H. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). **Science**, Washington, v. 296, p. 92-100, 2002.

GÖHRE, V.; ROBATZEK, S. Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 46, p. 189-215, 2008.

GRAICHEN, F.A.S. **Componentes epidemiológicos e histológicos da resistência à ferrugem da folha em genótipos de aveia**. 2009. 116 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do

Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 575-607, 1997.

HARDER, D.E. Electron microscopy of urediospore formation in *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 54, p. 1010-1019, 1976.

HARDER, D.E.; HABER, S. Genetics and inheritance in oat. In: MARSHALL, H.G.; SORRELS, M.E (Eds.) **Oat science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 1992.

HARDER, D.E.; HABER, S. Oat diseases and pathologic techniques. In: WELCH, W.R. **The oat crop**. Northern Ireland: Chapman & Hall, 1995. 584 p.

HEATH, M.C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, p. 315-319, 2000.

HEATH, M.C. Resistance of plants to rust infection. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 77, p. 971-974, 1981.

HEATH, M.C. Signalling between pathogenic rust fungi and resistance or susceptible host plants. **Annals of Botany**, Ottawa, v. 80, p. 713-720, 1997.

HOLUB, E.B.; COOPER, A. Matrix, reinvention in plants: how genetics is unveiling secrets of non-host disease resistance. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 9, p. 211-214, 2004.

HOOGKAMP, T. J. H.; CHEN, W.Q.; NIKS, R. E. Specificity of prehaustorial resistance to *Puccinia hordei* and to two inappropriate rust fungi in barley. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, p.856-861, 1998.

HU, G.; RIJKENBERG, F. H. J. Scanning electron microscopy of early infection structure formation by *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* on and in susceptible and resistant wheat lines. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, p. 391-399, 1998.

HUERTA-ESPINO, J.; SINGH, R.P.; GERMAN, S.; MCCALLUM, B.D.; PARK, R.F.; CHEN, W.Q.; BHARDWAJ, S.C.; GOYEAU, H. Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. **Euphytica**, Dordrecht, v. 179, p. 143-160, 2011.

JACOBS, T. Abortion of infection structures of wheat leaf rust in susceptible and partially resistant wheat genotypes, **Euphytica**, Dordrecht, v. 45, p. 81-86, 1990.

JACOBS, T. Germination and appressorium formation of wheat leaf rust on susceptible, partially resistant and resistant wheat seedlings and on seedlings of other *Gramineae*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 95, p. 65-71, 1989a.



JACOBS, T. The occurrence of cell-wall appositions in flag leaves of spring wheats, susceptible and partially resistant to wheat leaf rust. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 127, p. 239-249, 1989b.

JAFARY, H.; SZABO, L. J.; NIKS, R. E. Innate nonhost immunity in barley to different heterologous rust fungi is controlled by sets of resistance genes with different and overlapping specificities, **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, p. 1270-1279, 2006.

JAGGER, L.J.; BERRY, C. N.T.; MACCORMACK, R.; BOYD, L.A. Histopathology provides a phenotype by which to characterize stripe rust resistance genes in wheat. **Plant Pathology**, Saint Paul, v. 1, p. 1-9, 2011.

JIANG, X.L.; KANG, Z.S. Ultrastructural changes in the interaction between *Puccinia striiformis* and wheat cultivar with slow-rusting resistance. **Agricultural Science in China**, [China], v. 9, p. 64-70, 2010.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, London, v. 444, p. 324-329, 2006.

JOHNSON, R. A critical analysis of durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 22, p. 309 - 330, 1984.

JØRGENSEN, J.H. Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in Barley. **Euphytica**, Dordrecht, v. 63, p. 141-152, 1992.

KANG, Z., HUANG, L. L., AND BUCHENAUER, H. Ultrastructural changes and localization of lignin and callose in compatible and incompatible interactions between wheat and *Puccinia striiformis*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Rostock, v. 109, p. 25-37, 2002.

KELLOGG, E. A. The grasses: a case study in macroevolution. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 31, p. 217-238, 2000.

KIM, C.Y.; ZHANG, S. Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. **The Plant Journal**, Heslington, v. 38, p. 142-151, 2004.

KLIEBENSTEIN, D.J.; ROWE, H.C. Anti-Rust Antitrust. **Plant Science**, Davis, v. 323, p. 1301-1302, 2009.

KOLMER, J.A.; LIU, J.Q. Simple inheritance of partial resistance to leaf rust in two wheat cultivars. **Plant Pathology**, Saint Paul, v. 50, p. 546-551, 2001.

KOWALSKA, A.; NIKS, R. E. Histology of quantitative resistance in flax to the flax rust fungus (*Melampsora lini*). **Canadian Journal of Plant Pathology**, Toronto, v. 21, p. 354-360, 1999.

KRUGER, W. M.; CARVER, T.L.W.; ZEYEN, R.J. Effects of inhibiting phenolic biosynthesis on penetration resistance of barley isolines containing seven powdery

mildew resistance genes or alleles. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 61, p. 41-51, 2002.

LALOI C.; APEL, K.; DANON, A. Reactive oxygen signalling: the latest news. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 323-328, 2004.

LAMB, C.; DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance, **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 251-275, 1997.

LAGOS, M.B.; MORAES FERNANDES, M.I.B.; CAMARGO, C.E. de O.; FEDERIZZI, L.C.; CARVALHO, F.I.F. Genetics and monosomic analysis of aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 14, p. 1011-1020, 1991.

LEONARD, K.J. Oat lines with effective adult plant resistance to crown rust. **Plant disease**, Saint Paul, v. 86, p. 593-598, 2002.

LEONARD, K.; SZABO L.J. Stem rust of small grasses caused by *Puccinia graminis*. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 6, p. 99-111, 2005.

LI, C.; BAI, Y.; JACOBSEN, E.; VISSER, R.; LINDHOUT, P., BONNEMA, G. Tomato defense to the powdery mildew fungus: differences in expression of genes in susceptible, monogenic and polygenic resistance responses are mainly in timing. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 62, p. 127-140, 2006.

LIPKA, V.; DITTGEN, J.; BEDNAREK, P.; BHAT, R.; WIERMER, M.; STEIN, M.; LANDTAG, J.; BRANDT, W.; ROSAHL, S.; SCHEEL, D.; LLORENTE, F., MOLINA, A.; PARKER, J.; SOMERVILLE, S.; SCHULZE-LEFERT, P. Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in Arabidopsis. **Science**, Washington, v. 310, p. 1180–1183, 2005.

LIPKA, V.; PANSTRUGA, R. Dynamic cellular responses in plant–microbe interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, p. 625-631, 2005.

LIU, J.Q.; HARDER, D.E. Components of resistance in barley to stem rust: pre and post-penetration development in seedling and adult plant leaves. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 74, p. 1305-1312, 1996.

LONG, D. L.; KOLMER, J. A. A North American system of nomenclature for *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, p. 525-529, 1989.

MA, Q.; SHANG, H.S. Ultrastructural analysis of the interaction between *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* and wheat after thermal induction of resistance. **Journal of Plant Pathology**, London, v. 86, p. 19-26, 2004.

McDONALD, B.A.; LINDLE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Reviews of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 349–79, 2002.

McINTOSH, R.A. Close genetic linkage of genes conferring adult plant resistance to leaf rust and stripe rust in wheat. **Plant Pathology**, Saint Paul, v. 41, p. 523-527, 1992.

McINTOSH, R.A.; WELLINGS, C. R.; PARK, R.F. **Wheat Rusts: an atlas of resistance genes**. Melbourne: CSIRO, 1995.

MANICKAVELU, A.; KAWAURA, K.; OISHI, K.; SHIN-I, T.; KOHARA, Y.; YAHIAOUI, N.; KELLER, B.; SUZUKI, A.; YANO, K.; OGIHARA, Y. Comparative gene expression analysis of susceptible and resistant near-isogenic lines common wheat infected by *Puccinia triticina*. **DNA Research**, Oxford, v. 17, p. 211-222, 2010.

QAMAR, M.; MUJAHID, M.Y.; KHAN, M.A.; NIKS, R.E.; ASIF, M. Evaluation of levels of non-hypersensitive resistance in different spring wheat cultivars to leaf rust. **Sarhad Journal of Agriculture**, Islamabad, v. 25, p. 233-241, 2009.

MARES, D.J. A; COUSENA, S. The interaction of yellow rust (*Puccinia striiformis*) with winter wheat cultivars showing adult plant resistance: macroscopic and microscopic events associated with the resistant reaction. **Physiological Plant Pathology**, Oxford, v. 10, p. 257-268, 1977.

MARTE, M.; MONTALBINI, P. Histological observation on *Uromyces phaseoli* and *Puccinia recondita* infection in allopurinol-treated susceptible plants. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, p. 163-168, 1999.

MARTINELLI, J.A. Major diseases on oats in South America. In: INTERNATIONAL OATS CONFERENCE, 6., 2000, Lincoln. **Proceeding...** Christchurch: New Zealand Institute for Crop & Food Research Limited, 2000. p. 276-282.

MARTÍNEZ, F.; NIKS, R.E.; SINGH, R.P.; RUBIALES, D. Characterization of *Lr46*, a gene conferring partial resistance to wheat leaf rust. **Hereditas**, Lund, v. 135, p. 111-114, 2001.

MAUCH-MANI B, SLUSARENKO AJ. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 203-212, 1996.

MELICHAR, J.P.E.; BERRY, S.; NEWELL, C.; MACCORMACK, R.; BOYD, L.A. QTL identification and microphenotype characterization of the developmentally regulated yellow rust resistance in the UK wheat cultivar Guardian. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 117, p. 391-399, 2008.

MELLERSH, D.G.; HEATH, M.C. An investigation into the involvement of defense signaling pathways in components of nonhost resistance of *Arabidopsis thaliana* to rust fungi also reveals a model system for studying rust fungal compatibility. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 16, p. 398-404, 2003.

MOERSCHBACHER, B.M.; NOLL, U.; OCAMPO, C.A.; FLOTT, B.E.; GOTTHARDT, U.; WÜSLEFELD, A.; REISENER, H.J. Hypersensitive lignification response as the mechanism of non-host resistance of wheat against oat crown rust. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 78, p. 609-615, 1990.

MOLDENHAUER, J.; MOERSHBACHER, B.M.; van der WESTHUIZEN, A.J. Histological investigation of stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*). **Plant Pathology**, Oxford, v. 55, p. 469-474, 2006.

MOLDENHAUER, J; PRETORIUS, Z. A.; MOERSCHBACHER, B. M.; PRINS, R.; VAN DER WESTHUIZEN, A.J. Histopathology and PR-protein markers provide insight into adult plant resistance to stripe rust of wheat. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v.9, p.137-145, 2008.

MONTESANTO, M.; BRADER, G.; PALVA, E.T. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 73-79. 2003.

NELSON, R. R. The meaning of disease resistance in plants. In: Nelson, R. R. (Ed.). **Breeding plants for disease resistance - concepts and applications**. London: The Pennsylvania State University Press, 1973. p. 13-25

NEILL S.; DASIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signalling. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 388-395, 2002.

NEU, C.; KELLER, B.; FEUILLET, C. Cytological and Molecular Analysis of the *Hordeum vulgare*-*Puccinia triticina* Nonhost Interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.16, p. 626-6337, 2003.

NIKS, R.E.; KIUPER, H.J. Histology of the relation between minor and major genes for resistance of barley to leaf rust. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, p. 55-59, 1983.

NIKS, R. E. Induced accessibility and inaccessibility of barley cells in seedling leaves inoculated with two leaf rust species. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 123, p. 296-308, 1989.

NIKS, R. E. Effect of germ tube length on the fate of sporelings of *Puccinia hordei* in susceptible and resistant barley. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, p.57-60, 1990.

NIKS, R.E.; DEKENS, R.G. Prehaustorial and posthaustorial resistance to wheat leaf rust in diploid wheat seedling. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, p. 847-851, 1991.

NIKS, R. E.; KERCKHOFFS, B. M. F. J.; DE LA ROSA, R. Susceptibility of cultivated and wild barley (*Hordeum vulgare* sensu lato) to the leaf rust fungi of wheat and wall barley. **Cereal Rusts Powdery Mildews Bulletins**, Cambridge, v. 24, p. 3-10, 1996.

NIKS, R. E.; MARCEL, T.C. Nonhost and basal resistance: how to explain specificity? **New Phytologist**, Cambridge, v. 182, p. 817-828, 2009.

NIKS, R.E. Failure of haustorial development as a factor in slow growth and development of *Puccinia hordei* in partially resistant barley seedlings. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 28, p. 309-322, 1986.

NIKS, R.E.; RUBIALES, D. Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialised fungal pathogens. **Euphytica**, Dordrecht, v. 124, p. 201-216, 2002.

O'CONNELL, R. J.; PANSTRUGA, R. Tête à tête inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. **New Phytologist**, Cambridge, v. 171, p. 699-718, 2006.

OH, S.K.; LEE, S.; CHUNG, E.; PARK, J.M.; YU, S.H.; RYU, C.M. Insight into Types I and II nonhost resistance using expression patterns of defense-related genes in tobacco. **Planta**, Germantown, v. 223, p. 1101-1107, 2006.

ORCZYKA, W.; DMOCHOWSKA-BOGUTAA, M.; CZEMBORB, H. J.; NADOLSKA-ORCZYKA, A. Spatiotemporal patterns of oxidative burst and micronecrosis in resistance of wheat to brown rust infection. **Plant Pathology**, London, v. 59, p. 567-575, 2010.

PANSTRUGA, R. Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, p. 320-326, 2003.

PANTER, S.N.; HAMMOND-KOSACK, K.; HARRISON, K.; JONES, J.D.G.; JONES, D.A. Developmental control of promoter activity is not responsible for mature onset of Cf-9B-mediated resistance to leaf mold in tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, p. 1099-1107, 2002.

PARLEVLIET, J.E. Partial resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei*. I. Effect of cultivar and development stage on latent period. **Euphytica**, Dordrecht, v. 24, p. 21-27, 1975.

PARLEVLIET, J. E. Present concepts in breeding for disease resistance private. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 30., 1997, Brasília. PALESTRAS. Brasília, 1997. p.7-15.

PARRY, A.L.; CARVER, T.L.W. Relationship between colony development, resistance to penetration and autofluorescence in oats infected with powdery mildew. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 3, p. 355-363, 1986.

PEART, J.R. *et al.* Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 99, p. 10865-10869, 2002.

PEROVIC, D.; STEIN, N.; ZHANG, H.; DRESCHER, A.; PRASAD, M.; KOTA, R.; KOPAHNKE, D.; GRANER, A. An integrated approach for comparative mapping in rice and barley with special reference to the *Rph16* resistance locus. **Functional and Integrative Genomics**, Heidelberg, v.4, p. 74-83, 2004.

POLAND, J.A.; BALINT-KURTI, P.J.; WISSER, R.; PRATT, R.C.; NELSON, R.J. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. **Trends in Plant Science**, Minneapolis, v. 14, p. 22-29, 2008.

QAMAR ,M.; MUJAHID, M.Y.; KHAN, M.A.; NIKS, R. E.; ASIF, M. Evaluation of levels of non-hypersensitive resistance in different spring wheat cultivars to leaf rust. **Journal Sarhad Journal of Agriculture**, Peshawar, v. 25, p. 233-241, 2009.

QI, X.; NIKS, R.E.; STAM, P.; LINDHOUT, P. Identification of QTLs for partial resistance to leaf rust (*Puccinia hordei*) in barley. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 96, p. 1205-1215, 1998.

RAMPITSCH, C.; BYKOVA, N.V.; MCCALLUM, B.; BEIMCIK, E.; ENS, W. Analysis of the wheat and *Puccinia triticina* (leaf rust) proteoms during a susceptible host-pathogen interaction. **Proteomics**, Dublin, v. 6, p. 1897-1907, 2006.

RAO, K.V.S. SNOW, J.P.; BERGGREN, J.T. Effect of growth stage and initial inoculum level on leaf rust development and yield loss caused by *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 127, p. 200-210, 1989.

READ, N.D.; KELLOCK, L.J.; COLLINS, T. J.; GUNDLACH, A. M. Role of topography sensing for infection-structure differentiation in cereal rust fungi. **Planta**, Berlin, v. 202, p. 163-170, 1997.

READ, N.D.; KELLOCK, L.J.; KNIGHT, H.; TREWAVAS, A.J. Contact sensing during infection by fungal pathogens. In: CALLOW, J.A.; GREEN, JR. (Eds) **Perspectives in plant cell recognition**. Cambridge: Cambridge University Press, U.K, 1992. p.137-192.

REIS, E. M.; CASA, R. T. & FORCELINI, C. A. Relação entre a severidade e a incidência da ferrugem da folha do trigo, causada por *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, p. 369-372, 1996.

REIS, E.M.; CASA, R.T.; MEDEIROS, C.A. **Diagnose, patometria e controle de doenças de cereais de inverno**. Londrina: ES, 2001. 94 p.

RIBEIRO do VALE, F.X.; PARLEVLIET, J.D.; ZAMBOLIM, L. Concepts in plant disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 577 - 589, 2001.

RODERICK, H. **Crown rust resistance in ryegrass**. Disponível em: <<http://www.iger.bbsrc.ac.uk/igdev/soils/pmi/pmi-people-hywel.htm>>. Acesso em: 12 jun 2009.

RODERICK, H.W.; THOMAS, B.J.; Infection of ryegrass by three rust fungi (*Puccinia coronata*, *P. graminis* and *P. loliina*) and some effect of temperature on the establishment of the disease and sporulation. **Plant Pathology**, Saint Paul, v. 46, p. 751-756, 1997.

ROELFS, A.P.; McVEY, D.V. Low infection types produced by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and wheat lines designated genes for resistance. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 7, p. 722-729, 1979.

ROELFS, A.P. **Resistance to leaf rust and stem rust in wheat**. In: BREEDING strategies for resistance to the rusts of wheat. Mexico, D.F: CIMMYT, 1988. p. 10-22.

ROELFS, A. P.; SINGH, R. P.; SAARI, E. E. **Rust diseases of wheat: concepts and methods of disease management**. Mexico, D. F.: CIMMYT., 1992. 81 p.

ROJAS-MOLINA, M. D. M.; RUBIALES, D.; PRATS, E.; SILLERO, J.C. Effects of phenylpropanoid and energetic metabolism inhibition on faba bean resistance mechanisms to rust. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, p. 60-65, 2007.

ROSA, S.B.; MCCALLUM, B.; BRULE-BABEL, A. Toropi, a source of leaf rust resistance genes in wheat. In: 2009 TECHNICAL WORKSHOP – BGRI, 2009, Cd.Óbregon, Sonora, México. **Poster abstracts**. Cd.Óbregon, Sonora, México, 2009.

RUBIALES, D.; MORAL, A. Prehaustorial resistance against alfalfa rust (*Uromyces striatus*) in *Medicago truncatula*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 239-243, 2004.

RUBIALES, D.; NIKS, R.E. Combination of mechanisms of resistance to rust fungi as a strategy to increase durability. **Options Méditerranéennes**, Belgrade, v. 40, p. 333-339, 2000.

RUBIALES, D.; NIKS, R.E. Low apressorium formation by rust fungi on *Hordeum chilense* lines. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 1007-1012, 1992a.

RUBIALES, D.; NIKS, R.E. Histological responses in *Hordeum chilense* to brown and yellow rust fungi. **Plant Pathology**, Saint Paul, v. 41, p.611-617, 1992b.

RUBIALES, D.; RAMIREZ, M.C.; NIKS, R.E. Avoidance of leaf rust fungi in wild relatives of cultivated cereals. **Euphytica**, Dordrecht, v. 87, p. 1-6, 1996.

SCHMELZER, E. Cell polarization, a crucial process in fungal defence. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 7, p. 411-415, 2002.

SHETTY N. P.; JØRGENSEN, H. J. L.; JENSEN, J. D.; & COLLINGE, D. B.; SHETTY, H. S. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 121, p. 267-280. 2008.

SILLERO, J.C.; RUBIALES, D. Histological characterization of resistance to *Uromyces viciae-fabae* in faba bean. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, p. 294-299, 2002.

SILVA, P.R. da. **Identificação e conversão de marcadores moleculares associados à resistência à ferrugem-da-folha em trigo**. 2002. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

SILVA, P.R. da. **Identificação de marcadores e caracterização de mecanismos moleculares associados à resistência à ferrugem-da-folha em trigo**. 2006. 137 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SINGH, R.P. Association between gene *Lr34* for leaf rust resistance and leaf tip necrosis in wheat. **Crop Science**, Madison, v. 32, p. 874-878, 1992.

SINGH, R.P.; GUPTA, A.K. Expression of wheat leaf rust resistance gene *Lr34* in seedlings and adult plants. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 76, p. 489-491, 1992.

SINGH, R.P.; RAJARAM, S. Resistance to *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in 50 Mexican bread wheat cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 31, p.1472-1479, 1991.

SINGH, R. P.; HUERTA-SPINO, J.; ROELFS, A. P. The wheat rusts. In: BREAD wheat: improvement and production. Roma: FAO. 2002. (FAO Plant production and protection series, n° 30). Disponível em: <[www.fao.org/DOCREP/006/Y4011E/y4011e0g.htm](http://www.fao.org/DOCREP/006/Y4011E/y4011e0g.htm)> Acesso em: 4 jun. 2009.

SINGH, R.P.; HUERTA-ESPINO, J.; WILLIAM, H.M. Genetics and breeding for durable resistance to leaf and stripe rusts in wheat. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 29, p. 121-127, 2005.

SINGH, R. P.; HUERTA-ESPINO, J.; BHAVANI, S.; HERRERA-FOESSEL, S. A.; SINGH, D.; SINGH, P. K.; VELU, G.; MASON, R. E.; JIN, Y.; NJAU, P. Race non-specific resistance to rust diseases in CIMMYT spring wheats. **Euphytica**, Dordrecht, v. 179, p. 175-186, 2011.

SOUSA, C.N.A. **Contribuição das cultivares de trigo de Strampelli para o melhoramento de trigo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. 5 p. (Embrapa Trigo. Documentos Online; 7). Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_do07.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do07.htm)>. Acesso em: 2 jun. 2011.

SOUTHERTON, S.G.; DEVERALL, B.J. Changes in phenolic acid levels in wheat leaves expressing resistance to *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 37, p. 437-450, 1990.

STADNIK, M.J.; BUCHENAUER, H. Accumulation of autofluorogenic compounds at the penetration site of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* is associated with both benzothiadiazole induced and quantitative resistance of wheat. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, p. 615-622, 1999.

STAPLES, R.C. Research on the rust fungi during the twentieth century. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 49-69, 2000.

STRUCK, C.; ERNEST, M.; HAHN, M. characterization of a developmentally regulated amino acid transporter (AAT1p) of the rust *Uromyces fabae*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 3, p. 23-30, 2002.

SZABO, L.J.; BUSHNELL, W.R. Hidden robbers: The role of fungal haustoria in parasitism of plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 7654-7655, 2001.

TAYLOR, J.; MIMS, C.W. Infection of and colony development within leaves of susceptible and resistance pearl millet and two nonhost by the rust fungus *Puccinia substriata* var. *indica*. **Mycologia**, Corballis, v. 83, p. 565-577, 1991.



TIBURZY, R.; REISENER, H. J. Resistance of wheat to *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* association of the hypersensitive reaction with the cellular accumulation of lignin-like material and callose. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 36, p.109-120, 1990.

VAN DER MERWE, M.; ERICSON, L.; WALKER, J.P.; THRALL, H.; PETER, J.; BURDON, J. Evolutionary relationships among species of *Puccinia* and *Uromyces* (*Pucciniaceae*, Uredinales) inferred from partial protein coding gene phylogenies. **Mycological Research**, London, p. 163-175, 2007.

VAN WEES. **Phenotypic analysis of arabidopsis mutants**: trypan blue stain for fungi, oomycetes, and dead plant cells. cold spring harbor protocols. Disponível em: <http://cshprotocols.cshlp.org/cgi/content/abstract/2008/9/pdb.prot4982>. Acesso em: 14 maio 2011.

VAZ PATTO, M.C.; RUBIALES, D. Identification and characterization of partial resistance to rust in a germoplasm collection of *Lathyrus sativus* L. **Plant Breeding**, Bonn, p. 495-500, 2009.

VIEDMA, L. Q. Identificación y utilización de resistencia genética durable a royas en trigo. In: SEMINARIO INTERNACIONAL RESISTENCIA A ROYAS EN TRIGO, 2003, La Estanzuela. **Resúmenes**. La Estanzuela: INIA, 2003. p. 4.

VLOT, A.C.; DEMPSEY, D.M.A.; KLESSIG, D.F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 47, p. 177-206, 2009.

VOEGELE, R., T. V.; MENDGEN, K. Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. **New Phytologist**, Cambridge, v. 159, p. 93-100, 2003.

VOEGELE, R.T.; STRUCK, C.; HAHN, M.; MENDGEN, K. The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. **Proceeding of National Academy of Science of United States of America**, Washington, v. 98, p. 8133-8138, 2001.

von RÖPENACK, E., PARR, A., SCHULZE-LEFERT, P. Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 272, p. 9013–9022, 1998.

WANG, X.; LIU, W.; CHEN, X.; TANG, C.; DONG, Y.; MA, J.; HUANG, X.; WEI, G.; HAN, Q.; HUANG, L.; KANG, Z. Differential gene expression in incompatible interactions between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction. **Plant Biology**, London, v. 10, p. 1-15, 2010.

WEBSTER, J.; WEBER, R. **Introduction to fungi**. 3. ed. Cambridge, UK : New York: Cambridge University Press, 2007.

WELCH, W.R. **The oat crop**. Northern Ireland: Chapman & Hall, 1995. 584 p.

WIT, P.J.G.M. A light and scanning-electron microscopic study of infection of tomato plants by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Amsterdam, v. 83, p. 109-122, 1977.

WYNN, W. K. Appressorium formation over stomata by the bean rust fungus: response to a surface contact stimulus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 66, p. 136-146, 1976.

YANG, Y.; SHAH, J.; KLESSIG, D.F. Signal perception and transduction in plant defense responses. **Gene & Development**, Colorado, v. 11, p. 1621-1639, 1997.

YAO, N.; IMAI, S.; TADA, Y.; NAKAUASHIKI, H.; ROSSA, Y.; PARK, P.; MAYAMA, S. Apoptotic cell death is a common response to pathogen attack in oats. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 15, p. 1000-1007, 1998.

YU, X.; WANG, X.; WANG, C.; CHEN, X.; QU, Z.; YU, X.; HAN, Q.; ZHAO, J.; GUO, J.; HUANG, L.; KANG, Z. Wheat defense genes in fungal (*Puccinia striiformis*) infection. **Functional and Integrative Genomics**, Boston, v. 10, p. 227-239, 2010.

YUN, B-W. ATKINSON, H.A.; GABORIT, C., GREENLAND, A.; READ, N.D. ; PALLAS, J. A.; LOAKE, G.J. Loss of actin cytoskeletal function and EDS1 activity, in combination, severely compromises non-host resistance in Arabidopsis against wheat powdery mildew. **The Plant Journal**, Oxford, v. 34, p. 768-777, 2003.

ZAMBENEDETTI MAGNANI, E.B.; ALVES, E.; ARAÚJO, D.V. Eventos dos processos de pré-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 156-160, 2007.

ZAMBINO, P.J. AND SZABO, L.J. Phylogenetic relationships of selected cereal and grass rusts based on rDNA sequence analysis. **Mycologia**, Corballis, v. 85, p. 401-414, 1993.

ZEYEN, R.J.; CARVER, T.L.W.; LYNCKJAER, M.F.. Epidermal cell papillae. In: BELANGER, R.R.; BUSHNELL, W.R.; DIK, A.J.; CARVER, T.L.W. (eds.) **The powdery mildews, a comprehensive treatise**. St Paul, MN, USA: APS Press, 2002. p. 107-125

ZHANG, H.S.; DE LA ROSA, R.; RUBIALES, D.; LUBBERS, H.H.; MOLENVELD, J.W.; NIKS, R.E. Role of partial resistance to *Puccinia hordei* in barley in defence of barley to inappropriate rust fungi. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 45, p. 219-228, 1994.

ZHANG, L.; MEAKIN, H.; DICKINSON, M. Isolation of genes expressed during compatible interactions between leaf rust (*Puccinia triticina*) and wheat using cDNA-AFLP. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 4, p. 469-477, 2003.

ZHANG, Z.; HENDERSON, C.; GURR, S.J. *Blumeria graminis* secretes an extracellular catalase during infection of barley: potential role in suppression of host defence. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 5, p. 537-547, 2004.

ZHAO, B.; LIN, X.; POLAND, J.; TRICK, H.; LEACH, J.; HULBERT, S. A maize resistance gene functions against bacterial streak disease in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 102, p. 15383-15388, 2005.

ZOLDAN, S. M.; BARCELLOS, A. L. Postulação de genes (*Lr*) de resistência à ferrugem da folha em cultivares brasileiras de trigo. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 27, p. 508-516, 2002.

## 9 APÊNDICES

TABELA 23. Coeficientes de correlação de Pearson entre os componentes histológicos da resistência à *Puccinia triticina* na fase de plântula, 48 horas após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2011.

Componentes histológicos da resistência	Produção de compostos autofluorescentes associados à formação de VSE (48 hai <sup>a</sup> )	Produção de espécies reativas de oxigênio (48 hai)	Morte celular (48 hai)
Produção de compostos autofluorescentes associados à formação de ASE (48 hai)	0,53 (0,354) <sup>b</sup>	0,48 (0,418)	0,66 (0,227)
Produção de compostos autofluorescentes associados à formação de VSE (48 hai)		-0,27 (0,657)	0,13 (0,829)
Produção de espécies reativas de oxigênio (48 hai)			0,32 (0,250)

<sup>a</sup> hai= horas após a inoculação

<sup>b</sup> Valores entre parênteses correspondem à probabilidade de  $\rho=0$ .

TABELA 24. Coeficientes de correlação de Pearson entre os componentes histológicos da resistência à *Puccinia triticina* na fase de planta adulta, 48 horas após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2011.

Componentes histológicos da resistência	Produção de compostos autofluorescentes associados à formação de VSE (48 hai <sup>a</sup> )	Produção de espécies reativas de oxigênio (48 hai)	Morte celular (48 hai)
Produção de compostos autofluorescentes associados à formação de ASE (48 hai)	0,99 (0,0002) <sup>b</sup>	-0,57 (0,425)	0,57 (0,240)
Produção de compostos autofluorescentes associados à formação de VSE (48 hai)		-0,58 (0,424)	0,69 (0,132)
Produção de espécies reativas de oxigênio (48 hai)			0,17 (0,605)

<sup>a</sup> Hai= horas após a inoculação

<sup>b</sup> Valores entre parênteses correspondem à probabilidade de  $\rho=0$ .

TABELA 25. Coeficientes de correlação de Pearson entre os componentes histológicos da resistência à *Puccinia triticina* na fase de plântula, 120 horas após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2011.

Componentes histológicos da resistência	Presença de colônias de <i>P. triticina</i>	Produção de compostos autofluorescentes associados à formação de ASE (120 hai <sup>a</sup> )	Produção de compostos autofluorescentes associados à formação de VSE (120 hai)	Produção de espécies reativas de oxigênio (120 hai)	Morte celular (120 hai)	Formação de papila (120 hai)
Presença de tecido esporogênico	0,94 ( $<0,001$ ) <sup>b</sup>	-0,62 (0,267)	-1 ( $<0,001$ )	-0,35 (0,200)	-0,23 (0,402)	-0,24 (0,397)
Presença de colônias de <i>P. triticina</i>		-0,62 (0,267)	-1 ( $<0,001$ )	-0,41 (0,131)	-0,24 (0,385)	-0,24 (0,380)
Produção de compostos autofluorescentes associados à formação de ASE (120 hai <sup>a</sup> )				0,15 (0,814)	0,61 (0,276)	0,25 (0,691)
Produção de compostos autofluorescentes associados à formação de VSE (120 hai)				0,72 (0,173)	0,25 (0,685)	0,25 (0,685)
Produção de espécies reativas de oxigênio (120 hai)					-0,08 (0,790)	-0,14 (0,614)
Morte celular (120 hai)						-0,24 (0,392)

<sup>a</sup> Hai= horas após a inoculação

<sup>b</sup> Valores entre parênteses correspondem à probabilidade de  $\rho=0$ .

TABELA 26. Coeficientes de correlação de Pearson entre os componentes histológicos da resistência à *Puccinia triticina* na fase de planta adulta, 120 horas após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2011.

Componentes histológicos da resistência	Presença de colônias de <i>P. triticina</i>	Produção de compostos autofluorescentes associados à formação de ASE (120 hai <sup>a</sup> )	Produção de compostos autofluorescentes associados à formação de VSE (120 hai)	Produção de espécies reativas de oxigênio (120 hai)	Morte celular (120 hai)
Presença de tecido esporogênico	0,85 ( $<0,001$ ) <sup>b</sup>	0,12 (0,822)	0,04 (0,928)	-0,29 (0,354)	-0,16 (0,526)
Presença de colônias de <i>P. triticina</i>		-0,21 (0,690)	-0,32 (0,538)	-0,16 (0,617)	-0,25 (0,319)
Produção de compostos autofluorescentes associados à formação de ASE (120 hai <sup>a</sup> )			0,69 (0,127)	-0,93 (0,07)	0,96 (0,002)
Produção de compostos autofluorescentes associados à formação de VSE (120 hai)				-0,33 (0,66)	0,61 (0,196)
Produção de espécies reativas de oxigênio (120 hai)					-0,55 (0,06)

<sup>a</sup> Hai= horas após a inoculação

<sup>b</sup> Valores entre parênteses correspondem à probabilidade de  $\rho=0$ .